

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2003年5月1日 (01.05.2003)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 03/035233 A1

(51) 国際特許分類: B01D 69/00, G01N 30/88, 1/10, 37/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP02/11144

(22) 国際出願日: 2002年10月28日 (28.10.2002)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2001-328747 2001年10月26日 (26.10.2001) JP  
特願2002-140814 2002年5月15日 (15.05.2002) JP  
特願2002-291465 2002年10月3日 (03.10.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 日本電気株式会社 (NEC CORPORATION) [JP/JP]; 〒108-8001 東京都港区芝五丁目7番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 飯田 一浩 (IIDA, Kazuhiro) [JP/JP]; 〒108-8001 東京都港区芝五丁目7番1号 日本電気株式会社内 Tokyo (JP). 井口 憲幸 (IGUCHI, Noriyuki) [JP/JP]; 〒108-8001 東京都港区芝五丁目7番1号 日本電気株式会社内 Tokyo (JP). 馬場 雅和 (BABA, Masakazu) [JP/JP];

〒108-8001 東京都港区芝五丁目7番1号 日本電気株式会社内 Tokyo (JP). 染谷 浩子 (SOMEYA, Hiroko) [JP/JP]; 〒108-8001 東京都港区芝五丁目7番1号 日本電気株式会社内 Tokyo (JP). 川浦 久雄 (KAWAURA, Hisao) [JP/JP]; 〒108-8001 東京都港区芝五丁目7番1号 日本電気株式会社内 Tokyo (JP). 佐野 亨 (SANO, Toru) [JP/JP]; 〒108-8001 東京都港区芝五丁目7番1号 日本電気株式会社内 Tokyo (JP). 阪本 利司 (SAKAMOTO, Toshikazu) [JP/JP]; 〒108-8001 東京都港区芝五丁目7番1号 日本電気株式会社内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 金田 暢之, 外 (KANEDA, Nobuyuki et al.); 〒107-0052 東京都港区赤坂1丁目9番20号 第16興和ビル 8階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): CA, CN, KR, US.

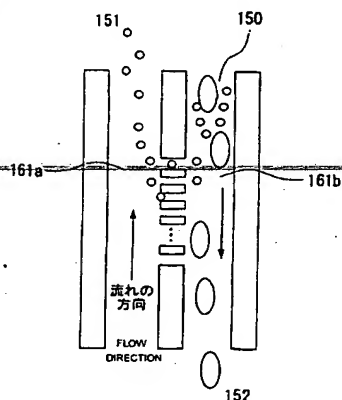
(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: SEPARATING DEVICE, ANALYSIS SYSTEM, SEPARATION METHOD AND METHOD FOR MANUFACTURE OF SEPARATING DEVICE

(54) 発明の名称: 分離装置、分析システム、分離方法および分離装置の製造方法



(57) Abstract: A separating device which comprises two flow route grooves separated by a partition wall and, provided between them, a plurality of separation routes which pass only the molecules having a predetermined size or less; and a separation method using the device. The separation method allows the separation of a substance having a small size, such as a cell, a nucleic acid and a protein to be carried out with a small amount of a sample, in a short time, with excellent resolution, and without causing problems of clogging and the like.

[続葉有]



---

(57) 要約:

隔壁により隔てられた 2 つの流路溝の間に所定の大きさ以下の分子のみを通過させる複数の分離流路が設けられた分離装置、ならびにそれを用いた分離方法を提供する。この分離技術により、細胞や核酸やタンパク質等の小さいサイズの物質を、少量の試料で短時間に優れた分解能で分別することが可能になり、目詰まり等の問題も解決した。

## 明 細 書

## 分離装置、分析システム、分離方法および分離装置の製造方法

## 技術分野

本発明は、試料中に含まれる複数の成分から特定の成分を分離する分離装置、分離方法に関し、さらにそのような分離装置を製造する方法に関するものである。

## 背景技術

一般に、試料中に含まれる特定成分の分析を行うにあたっては、まず試料の前処理を行い、分析対象物質を精製しておくことが重要となる。中でも生体由来試料は、さまざまな大きさを有し異なる性状を示す多量の成分が含まれていることが多く、前処理を適切に行うことが分析の精度および効率を向上させる上で欠かせない。

生体物質の分析に際しては、たとえば、

- (i) 細胞とその他の成分の分離、濃縮
- (ii) 細胞を破壊して得られる成分のうち、固形物（細胞膜の断片、ミトコンドリア、小胞体）と液状分画（細胞質）の分離、濃縮
- (iii) 液状分画の成分のうち、高分子量成分（DNA（デオキシリボ核酸）、RNA（リボ核酸）、タンパク質、糖鎖）と低分子量成分（ステロイド、ブドウ糖等）の分離、濃縮
- (iv) 高分子の分解産物と未分解産物の分離

---

といった前処理が、行われる。

ところが、このような前処理は、通常、煩雑な操作を要する上、分析対象成分が変性することがあり、また、サンプル量を多く必要とする等、改善すべき多く

の課題を抱えていた。たとえば上記(i)の処理では、遠心分離あるいは血清分離等のプロセスが利用されるが、この場合、室温で数分間の間試料を凝固させる必要があり、その間に試料が分解することがあった。また(ii)の処理では、超遠心分離器にて数十分から数時間かけて遠心分離を行う必要があり、処理時間が長いという課題を有していた。(iii)の処理では、エタノールや高濃度の塩を用いた化学処理と遠心分離を組み合わせる必要があり、操作が煩雑で処理に長時間を要する上、操作中に試料が変性することがあった。さらに(iv)の処理では、ゲル濾過や電気泳動が必要となるため、操作が煩雑な上、十分に高い回収率を達成することが困難であった。

ここで、下記特許文献1において、基材の表面に形成され、試料を流すための流路を備え、その流路を分割する多孔質体からなる隔壁を備えた微小膜分離デバイスが開示されている。このデバイスにおいては、試料を上記多孔質体からなる隔壁に通過させることにより分離を達成する。しかし、このデバイスは試料の導入口と流出口を各々一つずつ備えた構成であるため、一旦導入された試料がこのデバイスから流出するためには、上記隔壁を通過することが不可避である。したがって、試料の隔壁の孔への詰まりが生じ、分離効率が低下することがあった。この詰まりが顕著に生じた状態で、さらに試料の導入のための圧力を加えると、隔壁の破損が生じることも懸念される。

(特許文献1)：特開2000-262871号公報

本発明は上記事情に鑑みなされたものであって、試料を、簡単な操作で効率よく分離する技術を提供することを目的とする。特に、生体由来物質を含む試料を、簡単な操作で、成分を変性させることなく高効率で分離する技術を提供することを目的とする。また本発明は、従来、複数の分離手法を用いて分離・精製していた試料を、一つの装置により多段階の分離を実現する分離技術を提供することを目的とする。



さらに本発明は、従来技術では実現できなかった様々な分離手法を実現することをも目的とする。

#### 発明の開示

本発明によれば、被分離試料となる流体の通過する第一の流路溝と、前記流体から分離された特定成分を含む流体の通過する第二の流路溝と、前記第一および第二の流路溝を隔てる隔壁と、が設けられた基板を備え、前記隔壁に、前記第一および第二の流路溝に連通し、第一の流路溝を通過する前記流体に含まれる特定成分のみが通過可能な複数の分離流路が設けられたことを特徴とする分離装置が提供される。

また本発明によれば、被分離試料となる流体の通過する第一の流路溝と、前記第一の流路溝に連通するように設けられた、前記被分離試料となる流体を前記第一の流路溝に導入するための導入口と、前記第一の流路溝に連通するように設けられた、前記被分離試料となる流体を前記第一の流路溝から流出させるための流出口と、前記被分離試料となる流体から分離された特定成分を含む流体の通過する第二の流路溝と、前記第二の流路溝に連通するように設けられた、流体を前記第二の流路溝に導入するための導入口と、前記第二の流路溝に連通するように設けられた、前記被分離試料となる流体から分離された特定成分を含む流体を前記第二の流路溝から流出させるための流出口と、前記第一および第二の流路溝を隔てる隔壁と、が設けられた基板を備え、前記隔壁に、前記第一および第二の流路溝に連通し、第一の流路溝を通過する前記流体に含まれる特定成分のみが通過可能な複数の分離流路が設けられたことを特徴とする分離装置が提供される。

---

#### 図面の簡単な説明

図1は、下記の図3中の分離用流路の構造を詳細に示した図である。

- 図 2 は、分離用流路の構造を示す図である。
- 図 3 は、本発明に係る分離装置の一例を示す図である。
- 図 4 は、分離用流路の構造を示す図である。
- 図 5 は、分離用流路の構造を示す図である。
- 図 6 は、試料の分離方式を説明するための図である。
- 図 7 は、試料の分離方式を説明するための図である。
- 図 8 は、試料の分離方式を説明するための図である。
- 図 9 は、チップに緩衝液を導入する方法を説明する図である。
- 図 10 は、分離用流路の構造を示す図である。
- 図 11 は、本発明の分離装置の製造方法を説明するための図である。
- 図 12 は、本発明の分離装置の製造方法を説明するための図である。
- 図 13 は、分離用流路の構造を示す図である。
- 図 14 は、分離用流路の構造を示す図である。
- 図 15 は、分離用流路の構造を示す図である。
- 図 16 は、ジョイントの構造を示す図である。
- 図 17 は、分離用流路の構造を示す図である。
- 図 18 は、分離用流路の構造を示す図である。
- 図 19 は、分離用流路の構造を示す図である。
- 図 20 は、実施例 1 で用いた分離装置の構造を示す図である。
- 図 21 は、実施例 1 で用いた分離装置の隔壁の走査型電子顕微鏡写真である。
- 図 22 は、実施例 1 の血漿の分離状況を観察した光学顕微鏡写真である。
- 図 23 は、実施例 1 のブドウ糖検出紙およびタンパク質検出紙による試験結果である。
- 図 24 は、分離流路の構造を示す図である。
- 図 25 は、分離流路の構造を示す図である。

図 2 6 は、本発明の実施形態に係る分離装置を示す図である。

図 2 7 は、本発明の実施形態に係る分離装置を示す図である。

図 2 8 は、本発明の実施形態に係る分離装置を示す図である。

図 2 9 は、本発明の実施形態に係る分離装置に試料を導入したときの様子を説明するための図である。

図 3 0 は、本発明の実施形態に係る分離装置を用いた分析の手順を説明するための図である。

図 3 1 は、本発明の実施形態に係る分離装置の分離流路部分の構造を示した図である。

図 3 2 は、本発明の実施形態に係る分離装置の分離流路部分の構造を示した図である。

図 3 3 は、本発明の実施形態に係る分離装置の分離流路部分の構造を示した図である。

図 3 4 は、本発明の実施形態に係る分離装置の分離流路部分の構造を示した図である。

図 3 5 は、(a) 本発明の実施形態に係る分離装置の分離流路部分の構造を示した図である；(b) 図 3 5 (a) の分離流路部分を形成する方法を、構造とともに示した図である。

図 3 6 は、ナノオーダーの孔を備える隔壁を設ける方法を説明するための図である。

図 3 7 は、ナノオーダーの孔を備える隔壁を設ける方法を説明するための図である。

図 3 8 は、図 3 7 (g) 中のアルミニウム酸化物からなる隔壁を拡大した図である。

図 3 9 は、本発明の実施形態に係る分析システムの構成を示した図である。

図40は、本発明の実施形態に係る分析システムの構成を示した図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明に係る分離装置は、被分離試料となる流体の通過する第一の流路溝と、前記流体から分離された特定成分を含む流体の通過する第二の流路溝との間に複数の分離流路が設けられた隔壁が備えられているため、試料に含まれる特定成分を分離して第一の流路溝から第二の流路溝へ移動させることができる。第二の流路溝へ移動させた特定成分は、その後、分取する、あるいは、分光分析等の分析を行った後、回収する、といった処理が施される。本発明の装置を用いれば、生体物質その他の試料を、簡単な操作で効率よく分離することができる。

上記装置における分離方式としては様々なものを採用することができる。たとえば分離流路の断面形状や断面積を略同一に揃え、試料流体中における成分のサイズや変形のしやすさ等によって篩い分ける方式とすることができる。

本発明の分離装置において、前記第二の流路溝に隣接し、前記第二の流路溝を通過する流体から分離された特定成分を含む流体の通過する第三の流路溝と、前記第二および第三の流路溝を隔てる隔壁と、が前記基板にさらに設けられ、前記隔壁に、前記第二および第三の流路溝に連通し、前記第二の流路溝を通過する流体に含まれる特定成分のみが通過可能な複数の分離流路が設けられた構成とすることができる。

このような構成とすることにより、いったん分離された試料に対して次のステップの分離処理を連続的に実行することができる。このため、従来、複数の分離装置を要していた分離処理を一つの装置で実行することが可能となり、分離処理の効率を顕著に向上させることができる。

また、本発明によれば、この分離装置を用いた分離方法であって、前記第二の流路溝に、前記被分離試料となる流体より浸透圧の高い流体を通過させ、前記第

三の流路溝に、前記第二の流路溝に通過させる流体より浸透圧の高い流体を通過させることを特徴とする分離方法が提供される。この方法によれば、第一の流路溝から第三の流路溝への方に浸透圧が生じる。そのため、上記隔壁を通過可能な成分は、この浸透圧によって同方向への移動を促される。したがって分離能がより一層向上する。

本発明によれば、複数の流路溝が設けられた基板を備え、該複数の流路溝のいずれかの部分に試料の導入口が設けられ、隣接する流路溝間に介在する隔壁に、各流路溝に連通し前記試料に含まれる特定成分のみを通過させる複数の分離流路が設けられたことを特徴とする分離装置が提供される。本発明の装置を用いれば、生体物質その他の試料を、簡単な操作で効率よく分離することができる。

上述した本発明に係る分離装置は、限外濾過膜を用いた分離装置と原理的に類似するが、濾過膜に相当する分離流路が基板に設けられた溝によって実現されている点で相違する。基板表面に作り込まれた溝によって試料の分離を行う方式を採用しているため、本発明は以下の作用効果を奏する。

第一に、分離流路のサイズ（幅、深さ）を所望の値に制御性良く作製することができる。このため、精度の高い分離が実現される。

第二に、分離される側の流路から分離された側の流路にいたる分離流路の断面形状を、所望の形状に制御性良く加工することができる。たとえば、弁構造を持った逆流防止作用を備えた分離流路とすることができる。また、逆洗浄のしやすい形状の分離流路とすることができる。このような構造を限外濾過膜において実現することは多くの技術的困難をともなう。

第三に、製造安定性、量産性に優れる分離装置とすることができる。上記構成の装置は、基板としてガラスやシリコン等を用いる場合、ドライエッチングまたはウェットエッチングを利用して作製することができる。また、熱可塑性樹脂によって基板を構成する場合、射出成型により作製することができる。さらに熱硬

化性樹脂により基板を構成する場合、所定の凹凸表面を有する金型を当接させた状態で加圧することによって形成することができる。

本発明の分離装置において、前記流路溝が三以上設けられた構成とすることができる。このような構成とすることにより、いったん分離された試料に対して次のステップの分離処理を連続的に実行することができる。このため、従来、複数の分離装置を要していた分離処理を一つの装置で実行することが可能となり、分離処理の効率を顕著に向上させることができる。

本発明の分離装置において、複数の前記分離流路は、所定の大きさ以下の成分のみが通過可能に形成された構成とすることができる。こうすることにより、複数の成分を含む試料から、大きさに応じて試料を篩い分けることができる。「所定の大きさ以下の成分のみが通過可能に形成された構成」とは、たとえば、複数の前記分離流路を、略同一の断面形状および略同一の断面積で形成した構成が例示される。こうすることにより、所定の大きさ以下の成分をより効率よく分離することができる。

本発明の分離装置において、前記分離流路は、基板表面に形成された溝状の流路とすることができる。こうすることにより、分離流路をリソグラフィ技術およびエッチング技術の組み合わせにより形成することが可能となり、所望のサイズ of 分離流路を精密かつ安定的に形成することができる。本発明において、成分の大きさ等により分離する方式を採用する場合、分離流路の断面形状および断面積を精密に揃えることが望まれる。またDNAやタンパク質等、微小サイズの成分を分離する場合、分離流路のサイズもナノレベルの水準で精密に加工することが望まれる。上記のように、分離流路を、基板表面に形成された溝状の流路とすれば、このような要請に応える分離装置を提供することができる。

本発明の分離装置において、各流路溝の内部に充填される流体に外力を付与する外力付与手段をさらに備えた構成とすることができる。また前記外力付与手段

は、一の流路溝における流体の流れ方向と、該流路溝に隣接する流路溝における流体の流れ方向とが、互いに逆方向となるように外力を付与することもできる。

本発明の分離装置において、前記分離流路は、一方の流路溝側が他方の流路溝側よりも拡大して開口する形状に形成された構成とすることができる。また、前記分離流路は、一方の流路溝側から他方の流路溝側に向けてテーパ状に形成された構成とすることができる。

本発明の分離装置において、前記分離流路は、前記分離流路と連通する一方の流路溝における流体の流れ方向に対して鋭角をなすように設けられ、他方の流路溝における流体の流れ方向に対して鈍角をなすように設けられた構成とすることができる。

本発明の分離装置において、前記分離流路の内壁に凹部を設けられた構成とすることができる。

本発明の分離装置において、前記流路溝および分流路溝は、エッチングにより形成された溝とすることができる。

本発明の分離装置において、一の流路溝の内壁が親水性表面を有し、該流路溝に隣接する流路溝の内壁が疎水性表面を有する構成とすることができる。

また本発明によれば、基板表面に、所定の形状にパターンニングされたマスクを設ける工程と、該マスクを利用して前記基板表面をエッチングし、複数の流路溝および隣接する流路溝に連通する複数の分離流路を形成する工程と、を含むことを特徴とする分離装置の製造方法が提供される。

本発明の製造方法において、基板表面にレジスト膜を形成する工程と、凹凸の設けられた成型面を前記レジスト膜に当接させた状態でレジスト膜を加圧し、前記レジスト膜に凹凸形状を付与する工程と、凹部のレジスト膜を除去し、レジスト開口部を設ける工程と、開口部の設けられたレジスト膜をマスクとして前記基板をエッチングし、複数の流路溝および隣接する流路溝に連通する複数の分離流

路を形成する工程と、を含む構成とすることができる。

また本発明に係る分離装置は、以下のようにして形成することができる。たとえば、少なくとも表面部分が樹脂材料により構成された基板に対し、凹凸の設けられた成型面を当接させた状態で基板を加圧することにより、前記表面部分に、複数の流路溝および隣接する流路溝に連通する複数の分離流路を形成する工程とすることができる。

本発明によれば、第一の流路、第二の流路およびこれらの流路の間に介在する隔壁を備え、該隔壁に、前記第一および第二の流路に連通する複数の分離流路が設けられた分離装置を用い、前記被分離試料となる流体から特定成分を分離する方法であって、被分離試料となる流体を前記第一の流路中で移動させ、前記被分離試料となる流体に含まれる特定成分を、前記分離流路を介して前記第二の流路に移動させるステップを含むことを特徴とする分離方法が提供される。

上記分離方法によれば、前記被分離試料となる流体に含まれる複数の成分を、それらの大きさや、やわらかさ、変形のしやすさ、親水性の度合いなどにより分離流路を通過できる物質と通過できない物質とに効率よく分離することができる。上記分離方法において、第二の流路溝へ移動させた所定成分は、その後、分取する、あるいは、分光分析等の分析を行った後、回収する、といった処理が施される。

上記分離方法において、複数の前記分離流路は所定の大きさ以下の成分のみが通過可能に形成された構成とすることができる。

また、本発明の分離方法において、前記特定成分はタンパク質またはDNAとすることができる。

本発明によれば、第一の流路、第二の流路およびこれらの流路の間に介在する隔壁を備え、該隔壁に、前記第一および第二の流路に連通する複数の分離流路が設けられた分離装置を用い、被分離試料となる流体から特定成分を分離する方法



であって、前記被分離試料となる流体と、前記被分離試料となる流体に含まれる特定成分と反応して反応生成物を放出する反応性粒子と、を前記第一の流路中で移動させるステップと、前記特定成分と前記反応性粒子とを反応させ、前記反応性粒子から前記反応生成物を放出させるステップと、前記反応生成物を、前記第一の流路または前記第二の流路を介して回収するステップと、を含むことを特徴とする分離方法が提供される。ここで、被分離試料は、反応性粒子と同時に導入してもよいし、反応性粒子を移動させた後に導入してもよい。

また、本発明によれば、第一の流路、第二の流路およびこれらの流路の間に介在する隔壁を備え、該隔壁に、前記第一および第二の流路に連通する複数の分離流路が設けられた分離装置を用い、被分離試料となる流体から特定成分を分離する方法であって、前記被分離試料となる流体に含まれる特定成分と反応して反応生成物を放出する反応性粒子を第一の流路中に導入し、前記分離流路中に固定するステップと、被分離試料となる流体を第二の流路および前記分離流路中で移動させるステップと、被分離試料に含まれる前記特定成分と前記反応性粒子とを反応させ、前記反応性粒子から前記反応生成物を放出させるステップと、前記反応生成物を、前記第一の流路または前記第二の流路を介して回収するステップと、を含むことを特徴とする分離方法が提供される。

上記分離方法によれば、上記特定成分が微量である場合にも、被分離試料中の他の成分のコンタミネーションが抑制され、効率よく分離することができる。また、上記特定成分がナノオーダーの分子サイズであっても、分子サイズに応じた分離装置を用いることができるので、効率よく分離することができる。

本発明の分離方法において、前記反応性粒子は細胞とすることができる。また、前記反応性粒子が高分子ビーズまたはガラスビーズと、前記特定成分に対する酵素あるいは基質とを含む構成とすることもできる。

また、本発明の分離方法において、前記反応には発色反応を用いることができ

る。こうすることにより、前記反応性粒子の発色を観察し、前記特定成分の量を検知することができる。

上記分離方法において、前記分離流路は、第一の流路溝側が第二の流路溝側よりも拡大して開口する形状に形成された構成とすることができる。このような構成とすることによって、前記反応性粒子が前記分離流路の開口部に固定されるため、容易に粒子の発色を観察することができる。さらに、このような構成にすることにより、前記分離流路に成分の逆流防止弁としての機能も付与されるため、分離精度を高めることができる。

本発明によれば、第一の流路、第二の流路およびこれらの流路の間に介在する隔壁を備え、該隔壁に、前記第一および第二の流路に連通する複数の分離流路が設けられた分離装置を用い、被分離試料となる流体から特定成分を分離する方法であって、被分離試料となる流体と、前記被分離試料となる流体に含まれる特定成分と特異的に結合する結合性粒子と、を前記第一の流路中で移動させるステップと、前記特定成分を前記結合性粒子に結合させるステップと、前記特定成分を前記結合性粒子から脱離させ、前記第一の流路または前記第二の流路を介して回収するステップと、を含むことを特徴とする分離方法が提供される。ここで、被分離試料は、結合性粒子と同時に導入してもよいし、結合性粒子を移動させた後に導入してもよい。

また、本発明によれば、第一の流路、第二の流路およびこれらの流路の間に介在する隔壁を備え、該隔壁に、前記第一および第二の流路に連通する複数の分離流路が設けられた分離装置を用い、被分離試料となる流体から特定成分を分離する方法であって、前記被分離試料となる流体に含まれる特定成分と特異的に結合する結合性粒子を前記第一の流路中に導入し、前記分離流路中に固定するステップと、前記被分離試料となる流体を前記第二の流路および前記分離流路中で移動させ、前記被分離試料となる流体に含まれる前記特定成分を前記結合性粒子に結

合させるステップと、前記特定成分を前記結合性粒子から脱離させ、前記第一の流路または前記第二の流路を介して回収するステップと、を含むことを特徴とする分離方法が提供される。

上記分離方法によれば、上記特定成分が微量である場合にも、被分離試料中の他の成分のコンタミネーションが抑制され、効率よく分離することができる。また、上記特定成分がナノオーダーの分子サイズであっても、分子サイズに応じた分離装置を用いることができるので、効率よく分離することができる。

本発明の分離方法において、前記前記特定成分と、前記特定成分と特異的に結合する結合性粒子との結合が、抗原-抗体、酵素-基質、糖鎖-レクチン、染色体またはヌクレオチド鎖-ヌクレオチド鎖、のいずれかによるものとすることができる。また、前記特定成分と特異的に結合する結合性粒子が発色するステップを含むことができる。

上記分離方法において、前記分離流路は、第一の流路溝側が第二の流路溝側よりも拡大して開口する形状に形成された構成とすることができる。このような構成とすることによって、前記反応性粒子が前記分離流路の開口部に固定されるため、容易に粒子の発色を観察することができる。さらに、このような構成にすることにより、前記分離流路に成分の逆流防止弁としての機能も付与されるため、分離精度を高めることができる。

本発明の分離方法において、前記被分離試料が生体由来試料または該生体由来試料の処理物とすることができる。

また本発明によれば、複数の流路およびこれらの流路のうち、互いに隣接する流路の間に介在する隔壁を備え、該隔壁に、前記互いに隣接する流路に連通する複数の分離流路が設けられた分離装置を用い、被分離試料となる流体から特定成分を分離する方法であって、

被分離試料となる流体を前記いずれかの流路中で移動させ、前記被分離試料に

含まれる特定成分を、前記分離流路を介してその他の流路に移動させるステップと、前記流体に、前記流路の進行方向とは異なる方向の圧力を加えるステップとを含むことを特徴とする分離方法が提供される。

この分離方法においては、被分離試料中の成分が、上記圧力により流路進行方向とは異なる向きに力を受けるため、上記分離流路を通過する機会が増える。そのため、分離能が向上する。

また本発明によれば、上記の分離方法において、前記流路の進行方向とは異なる二方向の圧力を、所定の間隔で交互に加えることを特徴とする分離方法が提供される。

このようにすることにより、分離能の向上に加え、上記分離流路の目詰まりを防止することが可能となる。

上記の分離方法において、前記圧力として電気浸透流を用いることができる。

また、上記の分離方法において、前記圧力として浸透圧を用いることもできる。

また本発明によれば、上記の分離装置において、前記流体に対して、前記流路溝の進行方向とは異なる方向の圧力を加えるための加圧手段をさらに設けたことを特徴とする分離装置が提供される。

また本発明によれば、上記の分離装置において、前記基板を覆う被覆がさらに設けられ、前記被覆の表面が疎水性表面であることを特徴とする分離装置が提供される。

この分析装置においては、ある流路溝に液体を導入したとき、当該液体はその流路溝に隣接する流路溝へ浸入することがない。さらに、この状態で、当該隣接する流路溝へ液体を加えると、両流路溝の液体は互いに混和される。

したがって、各流路溝に液体を同時に導入する必要がないため、試料や緩衝液などを各流路溝に導入する際の操作が容易となる利点を有する。

上記の分離装置において、前記流路溝のうち少なくとも一つの流路溝に、前記

被分離試料を分離する分離領域をさらに設けてもよい。

また本発明によれば、上記の分離装置を用い、被分析試料を分析する方法であって、該被分析試料を前記分離領域が設けられた流路溝に導入し、該流路溝において前記被分析試料を分離する第一ステップと、前記分離領域が設けられた流路溝に隣接する流路溝に前記被分析試料を検出するための検出試薬を含む流体を導入する第二ステップと、を含むことを特徴とする分析方法が提供される。

また本発明によれば、上記の分析方法において、前記被分析試料が、複数のアイソザイムを含有することを特徴とする分析方法が提供される。

また本発明によれば、複数の流路およびこれらの流路のうち、互いに隣接する流路の間に介在する隔壁を備え、該隔壁に、前記互いに隣接する流路に連通する複数の分離流路が設けられた分離装置であって、前記流路溝のうち少なくとも一つの流路溝に、吸水材を配設したことを特徴とする分離装置が提供される。

この分離装置によれば、流路を試料に通過させながら濃縮することが可能となる。

また本発明によれば、複数の流路溝およびこれらの流路溝のうち、互いに隣接する流路溝の間に介在する隔壁を備え、該隔壁に、前記互いに隣接する流路溝に連通する複数の分離流路が設けられた分離装置であって、前記流路溝のうち、互いに隣接する少なくとも二つの流路溝に吸水材を配設し、各々の流路溝に配設された吸水材の吸水能力が互いに異なり、当該吸水能力の序列に基づき、前記吸水材が配設された流路溝が配置されたことを特徴とする分離装置が提供される。

このような構成とすることにより、より効果的に試料を濃縮することができる。

また本発明によれば、流路溝が設けられた基板を備える分離装置であって、前記流路溝底面上に、前記流路溝を分割するように前記流路の進行方向に沿って土手部が設けられ、前記土手部の高さが前記流路溝の深さよりも低いことを特徴とする分離装置が提供される。

また本発明によれば、流路溝が設けられた基板と、その基板を覆う被覆を備える分離装置であって、前記被覆の面のうち、前記基板側の面上に、前記基板と前記被覆と当接した状態で前記流路溝を分割するように、土手部が設けられ、前記土手部の高さが前記流路溝の深さよりも低いことを特徴とする分離装置が提供される。

上記分離装置においては、被覆と土手部との間に形成される隙間、あるいは土手部と流路溝の底面との間に形成される隙間を介して二本の流路溝が連通された構成となっている。この隙間が上記分離装置における分離流路と同様の役割を果たすことにより、分離を実現することができる。

また本発明によれば、上記の分離装置において、上記分離流路が陽極酸化法により設けられたことを特徴とする分離装置が提供される。

上記分離流路はナノオーダーのサイズ of 分離流路を備えるため、極めて小さなサイズのタンパク質の分離を実現することが可能となる。

また本発明によれば、上記の分離装置において、上記隔壁が、陽極酸化法により酸化され、多数の凹部が設けられた金属膜であることを特徴とする分離装置が提供される。

上記凹部の底部は0.1 nmオーダーの原子格子からなる薄膜となるため、この薄膜を介してイオンの分離が可能となる。

また本発明によれば、基板と、その基板上に設けられた第一の流路溝と、その第一の流路溝に隣接して前記基板上に設けられた第二の流路溝と、その第二の流路溝に隣接して前記基板上に設けられた第三の流路溝と、前記第一の流路溝と第二の流路溝との間に設けられ、複数の開口部を有する隔壁と、前記第二の流路溝と第三の流路溝との間に設けられ、複数の開口部を有する隔壁と、を備え、前記第二の流路溝内に多孔質体が充填されたことを特徴とする分離装置が提供される。

この分離装置においては、上記多孔質体の多数の孔が上述の分離流路の役割を

果たす。例えば、多孔質体として高分子ゲル膜を用いる場合、当該膜の微小な網目構造が孔に相当する。そのため、分離対象がナノメートルオーダーのサイズの場合であっても分離を実現することが可能となる。

また本発明によれば、特定成分を検出するための分析システムであって、上記の分離装置と、当該分離装置により分離された前記特定成分を検出するための検出部とを含むことを特徴とする分析システムが提供される。

本発明における流路溝は、流体が当該流路溝に導入される導入口と、流体が当該流路溝から流出する流出口とを備える。したがって、本発明の分離装置の流路溝内においては、過度の圧力がかかることがないため、安定した分離を実現できる。また、流路溝を流れる流体の流れの方向と、隔壁に設けられた分離流路の方向とが異なるため、分離流路に対する試料の詰まりが生じにくい。さらに、流体を流す方向を適宜選択することができるため、例えば第一の流路溝に流す流体の方向と、第一の流路溝に隣接する第二の流路溝に流す流体の方向とを互いに逆方向とすることにより、分離能を向上させることも可能となる。

本発明における複数の流路溝は、試料原液の通る流路溝と、原液から所定成分、たとえば所定の大きさ以上の成分、が除かれた分離後の試料の通る流路溝とを含むものである。分離後の試料の通る流路溝は複数設けることができる。たとえば、原液から1段目の分離を行った試料から、さらに所定成分を除去した分離後の試料の通る流路溝を設け、多段分離方式による分離装置とすることができる。

本発明において、分離対象の試料は、キャリア中に所定成分が溶解または分散した試料とする。キャリアは液体または気体とすることができる。本発明の装置を生体物質の分離に用いる場合は、キャリアとして純水、純水と親水性溶媒の混合液、緩衝液等を用いることが好ましい。具体的には、水とイソプロピルアルコールの混合液、トリメチルアンモニウム、ホウ酸およびエチレンジアミン四酢酸(EDTA)を含む水溶液、リン酸ナトリウム水溶液、リン酸緩衝生理食塩水等

が好適に用いられる。

本発明に係る分離装置において、流路溝の内部に充填される流体に外力を付与する外力付与手段をさらに備えた構成とすることができる。外力付与手段の具体例としては、ポンプ、電圧印加手段等を例示することができる。外力付与手段は、各流路溝にそれぞれ設けても、複数の流路溝に対して一つ設けてもよい。各流路溝にそれぞれ設けた場合は、各流路溝における流体の流れ方向をそれぞれ任意に変えることができ、これにより、特有の分離性能を実現することができる。

本発明において、試料原液や分離後の流体の流れ方向に外力を付与する外力付与手段に加え、分離流路の形成方向に外力を付与する外力付与手段をさらに設けることもできる。たとえば、試料流路にポンプを配設し、分離流路の形成方向に電圧を印加する構成を採用することもできる。このような構成の例を図2を用いて説明すると、たとえば、流路溝161a、流路溝161bの流れの方向にポンプを配設し、流路溝161aと流路溝161bとを連通する分離流路の長さ方向、すなわち流路溝161a、流路溝161bの流れに垂直な方向に電圧を印加することができる。このようにすれば、物質のサイズによる分別だけでなく、物質固有のゼータ電位による分別等を併用し、試料を分離することができる。

本発明における分離流路は、分離流路と連通する一方の流路溝側が他方の流路溝側よりも拡大して開口する形状とすることができる。また、一方の流路溝側から他方の流路溝側に向けてテーパ状に形成された溝とすることができる。このようにすれば分離流路が、分離成分の逆流防止弁としての機能を備えたものとなる。また、同程度の大きさを持った成分を構造変形の容易性ややわらかさなどによって分離することにも利用可能である。ここで、構造変化の容易性ややわらかさは、たとえば、成分が隔壁に設けられた開口部を通り抜ける際にコンフォメーション変化することによるエンタルピー変化の大きさや、弾性力の大きさの差などに起因する。



本発明において、分離流路は、分離流路と連通する一方の流路溝における流体の流れ方向に対して鋭角をなすように設けられ、他方の流路溝における流体の流れ方向に対して鈍角をなすように設けられた構成とすることができる（図 6、図 24）。ここで、「流路溝における流体の流れ方向に対して鋭角をなす」とは、分離流路の開口部から分離流路の形成された方向と、その流路溝に満たされた試料の流れ方向（外力付与方向）とのなす角が鋭角であることをいう。たとえば図 6 の流路溝 161a と、隔壁 165 に設けられた分離流路との関係をいう。また、「流路溝における流体の流れ方向に対して鈍角をなす」とは、分離流路の開口部から分離流路の形成された方向と、その流路溝に満たされた試料の流れ方向（外力付与方向）とのなす角が鈍角であることをいう。たとえば図 6 の流路溝 161b と、隔壁 165 に設けられた分離流路との関係をいう。このような構成を採用することにより、分離流路が逆流防止弁としての機能を有し、分離効率をさらに向上することができる。

本発明において、分離流路は、分離流路の内壁に凹部を設けられた構成とすることができる（図 19）。かかる構成とした場合、分離流路の通過に要する時間が、凹部への捕獲されやすさによって相違することとなる。すなわち、凹部に捕獲されやすい成分は、凹部に捕獲されにくい成分よりも、分離流路の通過時間が長くなる。このため、流路溝 161b において、複数の成分を順次分取することが可能となる。

本発明に係る分離装置において、外力付与手段は、一の流路溝における流体の流れ方向と、該流路溝に隣接する流路溝における流体の流れ方向とが、互いに逆方向となるように外力を付与するものとすることができる（図 8、図 24）。このようにした場合、分離成分の濃度分布の関係で分離効率を向上させることができる。

本発明に係る分離装置において、一の流路溝の内壁が親水性表面を有し、この

流路溝に隣接する流路溝の内壁が疎水性表面を有する構成を採用することができる。このような構成を採用することにより、親水性の物質について、分離流路が逆流防止弁としての機能を有し、分離効率をさらに向上させることができる。

本発明に係る分離装置において、流路溝が三以上設けられた構成とすることができる。このような構成を採用することにより、一つの装置により多段分離を実現できる上、分離対象成分のサイズに応じて、複数の流路の中から適切な流路のみを選択して分離を行うことが可能となる。これにより、一つの装置で多様な試料の分離を効率的に行うことが可能となり、洗浄も容易となる。

本発明の分離装置は、流体中にサイズの異なる成分が溶解または分散した試料の分離・精製に好適に用いることができる。液体中に溶解した成分の分離や、固液分離、エマルジョンの濃縮等に用いることができる。

また、特に生体物質の分離処理や脱塩処理を行うのに適している。たとえば、人間や他の動物の血液や唾液等を試料とし、以下の成分の分離・濃縮に用いるのに適している。

(i)細胞とその他の成分の分離、濃縮

(ii)細胞を破壊して得られる成分のうち、固形物（細胞膜の断片、ミトコンドリア、小胞体）と液状分画（細胞質）の分離、濃縮

(iii)液状分画の成分のうち、高分子量成分（DNA、RNA、タンパク質、糖鎖）と低分子量成分（ステロイド、ブドウ糖等）の分離、濃縮

(iv)高分子の分解産物と未分解産物の分離

本発明に係る分離装置は、微小サイズの物質の分離も可能であり、様々なサイズの核酸断片をはじめとする核酸、あるいは、アミノ酸・ペプチド・タンパク質などの有機分子、金属イオンなど、コロイド等の分離・精製に適用することもできる。

なお、本発明における分離装置は、試料分離領域を備えているものであればよ

く、サンプル導入領域や外力付与手段は装置自体に備わっていなくてもよい。たとえば、本発明における分離装置を使い捨て型のカートリッジタイプとし、これを、所定のユニットに組み込んで使用する方式とすることもできる。

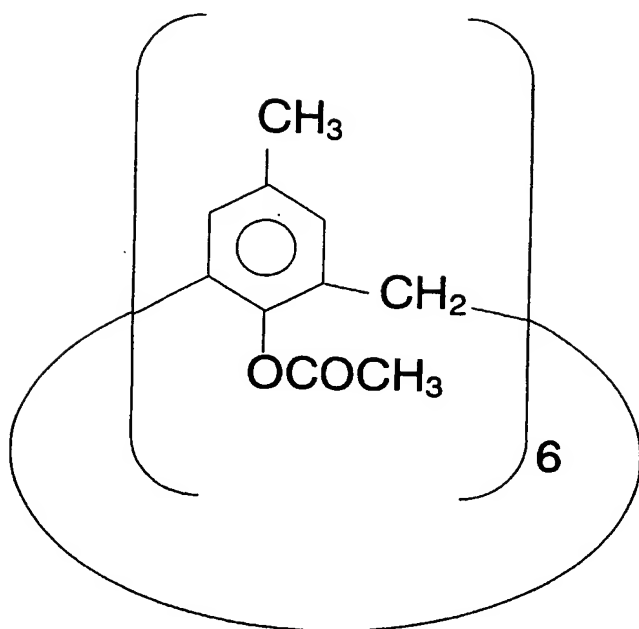
本発明の分離装置において、分離流路は、たとえば多数の柱状体が所定の間隔で配置された構成により実現することができる。柱状体間の間隔が分離流路となる。柱状体の形状は、円柱、楕円柱等、擬円柱形状；円錐、楕円錐、三角錐等の錐体；三角柱、四角柱等の角柱のほか、ストライプ状の突起等、さまざまな形状を含む。

分離流路の幅は、分離目的に応じて適宜設定される。たとえば、

- (i)細胞とその他の成分の分離、濃縮
  - (ii)細胞を破壊して得られる成分のうち、固形物（細胞膜の断片、ミトコンドリア、小胞体）と液状分画（細胞質）の分離、濃縮
  - (iii)液状分画の成分のうち、高分子量成分（DNA、RNA、タンパク質、糖鎖）と低分子量成分（ステロイド、ブドウ糖等）の分離、濃縮
- といった処理において、

- (i)の場合、 $1\ \mu\text{m} \sim 10\ \mu\text{m}$ 、
  - (ii)の場合、 $100\ \text{nm} \sim 1\ \mu\text{m}$ 、
  - (iii)の場合、 $1\ \text{nm} \sim 100\ \text{nm}$ 、
- とする。

たとえば $100\ \text{nm}$ 以下のような狭い幅の流路を形成することは、従来技術では非常に困難であったが、本発明者は、このような構造の分離装置を、微細加工用レジストのカリックスアレーンを用いた電子線リソグラフィ技術を利用して柱状体を形成することにより、作製できることを見いだした。カリックスアレーンの分子構造の一例を以下に示す。カリックスアレーンは電子線露光用のレジストとして用いられ、ナノ加工用のレジストとして好適に利用することができる。



本発明において、流路や試料分離領域は、シリコン基板や石英等のガラス基板あるいはシリコン樹脂等の樹脂基板の表面に形成することができる。これらの基板の表面に溝部を設け、これを表面部材によって封止し、これらによって囲まれた空間内に流路や試料分離領域を形成することができる。

本発明における流路や分離流路は、たとえば、基板を所定のパターン形状にエッチングすることにより形成することができるが、その作製方法は特に制限はない。

次に、図面を参照して本発明の実施形態について説明する。なお、以下の実施形態においては、

(i)細胞とその他の成分の分離、濃縮、

(ii)細胞を破壊して得られる成分のうち、固形物（細胞膜の断片、ミトコンドリア、小胞体）と液状分画（細胞質）の分離、濃縮、

(iii)液状分画の成分のうち、高分子量成分（DNA、RNA、タンパク質、糖鎖）と低分子量成分（ステロイド、ブドウ糖等）の分離、濃縮、

といった処理を行うものとする。

また、以下の実施の形態では、特にことわりがない限り、一つの隔壁に設けられた分離流は、略同一の断面形状および略同一の断面積を有するものとする。

(第1の実施形態)

図1は、本発明に係る分離装置の一例を示す図である。

基板166上に流路溝161aおよび流路溝161b（いずれも幅W、深さD）が形成され、これらの間に隔壁165が介在している。隔壁165には、分離流路が規則的に形成されている。分離流路は、流路溝161aおよび流路溝161bと直交し、幅d1の分離流路が所定の間隔d2で規則的に形成されている。図中に示された各寸法は、分離する試料等に応じて適宜な値に設定されるが、たとえば以下のような範囲から好適な数値が選択される。

W : 10  $\mu$ m ~ 1000  $\mu$ m

L : 10  $\mu$ m ~ 1000  $\mu$ m

D : 50 nm ~ 1000  $\mu$ m

d1 : 10 nm ~ 1  $\mu$ m

d2 : 10 nm ~ 1  $\mu$ m

このうち、分離流路の長さに対応するLの数値は、分離特性に直接影響するため、分離目的に応じて精密に設計することが重要となる。たとえば高分子の分離においては、分離流路を通過する際に分子のコンフォメーションが変化し、エンタルピー変化が生じる。したがって、分離流路の長さによって分子の通過に伴うエンタルピー変化の総量が相違することとなり、分離特性が変化するのである。本発明においては、流路を溝により構成しているため、エッチングや成型加工により作製することができ、形状やサイズを精密に制御することができる。この結

果、所望の分離特性を有する分離装置を安定的に製造することができる。なお、流路溝 161a、流路溝 161b および分離流路は、様々は方法で形成することができるが、d1 や d2 の値を 100 nm 以下に設定した場合、微細加工性の点で電子線露光技術を組み合わせたドライエッチングを用いることが望ましい。

図 3 は本発明に係る分離装置全体の概略構成図である。基板 166 上に流路溝 161a および流路溝 161b が形成され、これらの間に隔壁 165 が介在した構造となっている。隔壁 165 の所定箇所には多数の分離流路が所定の間隔で形成されている。流路溝 161a および流路溝 161b の両端には、図 9 に示す形状のジョイント 168a～d が配置され、これらを介してポンプ（不図示）が接続されている。このポンプにより、流路溝 161a および流路溝 161b 中に満たされた溶媒に外力が付与され、一定方向に流動するようになっている。なお、本実施形態では外力付与手段としてポンプを採用し、圧力により溶媒（キャリア）や溶媒中の成分を流動させているが、これ以外の外力付与手段を採用することももちろん可能である。たとえば、流路に電圧を印加する等の方法を採用することもできる。この場合は、ジョイントをたとえば図 16 のような構造とする。

図 1 に示した構造の分離装置を用いた分離方法について図 2 を参照して説明する。図 2 は、この分離装置を上から見たときの概略構造を示した模式図である。まず、試料の分離を行う前の準備として、各流路溝にキャリアとなる緩衝液を満たしておく。図 2 では、流路溝 161b 中に、図中下向きに混合物 150 を含む試料原液が流れる。すると、混合物中の小さな分子 151 が、図の中央に示される隔壁に設けられた分離流路を通過し、隣接する流路溝 161a に進入する。流路溝 161a には、分離目的成分と化学反応を起こさない溶媒が図中上向きに流れている。したがって、流路溝 161a に進入した小さな分子 151 は、その流れによって図中上向きの方向に運搬される。一方、流路溝 161b 中の大きな分子 152 は、分離流路を通過できないので、流路溝 161b 中をそのまま流れて

いき、流路の末端で回収される。以上のようにして、小さな分子151および大きな分子152が分離される。

上記装置では、流路溝161aおよび流路溝161bの流れの方向を逆向きとした。同じ向きとすることもできるが、本実施形態のように逆向きにした場合、分離効率が向上する。たとえば流路溝161aの流れの方向を図中下向きとした場合、流れの進行方向に向かうにしたがって小さな分子151の濃度が高くなっていく。したがって、流路溝161aと流路溝161bにおける大きな分子152の濃度差が、流れの進行方向に向かうにしたがって小さくなり、ある地点で等濃度となる。この地点から先の領域では、流路溝161bから流路溝161aへの大きな分子152の移動は起こりにくくなり、分離できなくなる。これに対して本実施形態のように逆向きの方向にした場合は、流路溝161aと流路溝161bにおける大きな分子152の濃度差は担保されるので、分離流路を一定の長さの領域にわたって形成した場合でも、高い分離能力を確保することができる。

本実施形態の分離装置では、たとえば試料原液の毛細管現象による導入と、拡散により分離できる。また、分子の浸透圧差を利用して分離することができる。

また、本実施形態の分離装置を用いる分離方法としては、被分離側の流路を、分離側の流路に比べて高い圧力状態とし、分離流路により濾過を行う方式を採用することもできる。具体的には、まず各流路溝にキャリアとなる緩衝液を満たし流路溝161bに試料原液を導入した後、流路溝161bの両端を解放にして一定時間、試料を流動させる。次いで、流路溝161bの両端を閉じ、緩衝液を静止させる。一方、流路溝161aの両端については解放にして緩衝液を流動させておく。流路溝161aよりも流路溝161bを高圧の状態とすることにより、

所定のサイズの成分が流路溝を経由して流路溝161a中に拡散する。流路溝161a内の緩衝液は流動状態にあるので、流路溝161aおよび流路溝161bの分離成分の濃度差は確保され、分離効率が良好に維持される。このような方式

によれば、サイズの大きい分子の濾別等において、処理時間の短縮を図ることができる。

なお、本実施形態ではポンプを用い圧力を付与することによって分離流路内の流体を流動させているが、圧力以外の外力を付与する構成とすることもできる。たとえば、分離装置の両端に電界を印加し、電気泳動あるいは電気浸透流を利用して分離流路内の流体を流動させることもできる。

次に本実施形態に係る分離装置の製造方法について図11および図12を参照して説明する。ここで、図11および図12は、図10に示す流路溝の構造におけるA-A'断面図である。まず、図11(a)に示すように、シリコン基板201上にシリコン酸化膜202、カリックスアレーン電子ビームネガレジスト203(55nm)をこの順で形成する。シリコン酸化膜202、カリックスアレーン電子ビームネガレジスト203の膜厚は、35nm、55nmとする。次に、電子ビーム(EB)を用い、試料の流路となるアレー領域を露光する。現像はキシレンを用いて行い、イソプロピルアルコールによりリンスする。この工程により、図11(b)に示すように、パターニングされたレジスト204が得られる。

つづいて全面にポジフォトレジスト205を塗布する(図11(c))。膜厚は1.8 $\mu$ mとする。その後、隔壁部分が露光するようにマスク露光をし、現像を行う(図11(d))。

次に、シリコン酸化膜202をCF<sub>4</sub>、CHF<sub>3</sub>の混合ガスを用いてRIEエッチングする。エッチング後の膜厚を35nmとする(図12(a))。レジストをアセトン、アルコール、水の混合液を用いた有機洗浄により除去した後、酸化プラズマ処理をする(図12(b))。つづいて、シリコン基板201をHBrガスを用いてECREッチングする。エッチング後のシリコン基板201のエッチング深さは、たとえば400nm以上1 $\mu$ m以下とすることができる。(図12(c))。つづいてBHFバッファードフッ酸でウェットエッチングを行い、シリ



コン酸化膜 202 を除去する (図 12 (d))。

以上のプロセスにより、図 10 に示す流路溝の構造が作製される。なお、上記のプロセスの後、適宜、親水性を付与するための表面処理等を行っても良い。たとえば、熱処理により表面に熱酸化を形成する、親水基をもつカップリング剤を塗布する、薬液と接触させることにより化学酸化する等の方法を採用してもよい。このとき、シリコン基板表面を化学酸化することにより、均一な薄膜を表面に形成することができ好ましい。化学酸化の方法としては、たとえば濃硝酸を用いることができ、2 nm 程度の薄膜を形成することができる。さらに、流路壁に対して DNA やタンパク質などの分子が粘着することを防ぐために、流路壁を付着防止処理することが好ましい。これにより、分離装置が良好な分離能を発揮することができる。親水性処理としては、例えば、細胞膜を構成するリン脂質に類似した構造を有する物質を流路壁にコーティングすることが挙げられる。このような物質としてはリピジュア (登録商標、日本油脂社製) などが例示される。リピジュア (登録商標) を用いる場合は、0.5 wt % となるように TBE (バッファードフッ酸) などの緩衝液に溶解させ、この溶液を流路内に満たし、数分間放置することによって流路壁をコーティングすることができる。そのようにすることによって、回収したい成分が、たとえばタンパク質などの生体成分である場合、成分の変性を防ぐ効果が発揮されるとともに、装置の流路への成分の非特異吸着を抑制することができるため、回収率を向上することができる。また、付着防止処理の他の方法として、たとえばフッ素樹脂によるコーティングが挙げられる。

なお分離対象が細胞である場合のように、分離流路の幅が 1  $\mu$ m 以上の分離装置については、通常の写真リソグラフィーとウェットエッチングによる方法によっても、製造できる。

## (第 2 の実施形態)

第 1 の実施形態では、被分離対象となる試料原液の通る流路と、分離後の液体

の流れる流路の2つの流路を備えた装置構成を採用したが、本実施形態では、さらに多くの分離流路を設けることにより、多段分離を実現する。

図4は本実施形態に係る装置の流路部分の構成を示す図である。本実施形態では、試料原液が流路溝161aを通り、1段目の分離後の試料が流路溝161bを通る。ここでは、N段目の分離用流路まで示している。隔壁165に形成される分離流路は、d1～dNへ進むにしたがって狭くなっていく。したがって、各流路から収集される成分のサイズは、図中左側に位置する流路から右側に位置する流路に向かって小さくなっていく。

このような多段分離は、従来技術においては一つの分離装置で実現することは困難であり、通常、複数の装置を用いた多段階のプロセスによって行われていた。たとえば中空系を用いた分離では、分離部分を多層構造にすることは実質的に不可能であるので、多段分離を行うには多段階のプロセスを採用することが必要となる。これに対し、本実施形態に示した構造の装置によれば、一つの装置を用いて一つのプロセスで多段分離を実現することができ、効率的である。また、分離後の逆洗浄も比較的容易である。この分離装置は、たとえば以下の分離・濃縮を行うのに適している。

(i)細胞とその他の成分の分離、濃縮

(ii)細胞を破壊して得られる成分のうち、固形物（細胞膜の断片、ミトコンドリア、小胞体）と液状分画（細胞質）の分離、濃縮

(iii)液状分画の成分のうち、高分子量成分（DNA、RNA、タンパク質、糖鎖）と低分子量成分（ステロイド、ブドウ糖等）の分離、濃縮

(iv)高分子の分解産物と未分解産物の分離

（第3の実施形態）

本実施形態に係る分離装置の分離流路部分の構造を図5に示す。この装置では、試料原液が流路溝161aを通り、分離後の試料が流路溝161bを通るように

なっている。分離流路は、流路溝 161 a 側が流路溝 161 b 側よりも拡大して開口する形状に形成されている。また、この分離流路は、流路溝 161 a 側から流路溝 161 b 側に向けてテーパ状に形成されている。このような構造とすることにより、分離流路が逆流防止弁としての機能を有し、分離効率をさらに向上することができる。試料中の小さいサイズの成分は、図中、矢印の向きに移動するが、矢印の反対の向きに移動することは難しい。このため小さいサイズの成分が効率良く流路溝 161 a から流路溝 161 b へ移動することになり、分離効率が顕著に向上する。

ここで、高分子成分や比較的大きい成分が開口部に濃縮し、分離効率が低下する可能性がある場合、開口部が二段階で拡大する構成とすることができる。たとえば図 5 において、高分子成分の分離液中での粒子径を  $d$  とすると、隔壁 165 の厚さ方向で、流路溝 161 b 側からたとえば  $0.6d \sim 0.7d$  程度の範囲までは、開口部の拡大を小さくし、 $0.7d$  より流路溝 161 a 側では開口部が大きく拡大している形状とすることもできる。このような構成とすることにより、高分子成分や比較的大きい成分が流路溝 161 b 側の小さい開口部に堆積、濃縮することを抑制することができるので、開口部を通過できる成分の分離をより効果的に行うことができる。

#### (第 4 の実施形態)

本実施形態に係る分離装置の分離流路部分の構造を図 6 に示す。この装置では、試料原液が流路溝 161 a を通り、分離後の試料が流路溝 161 b を通るようになっている。分離流路は、流路溝 161 a の流れ方向（図中白抜き矢印）に対して鋭角をなすように設けられ、流路溝 161 b の流れ方向（図中白抜き矢印）に対して鈍角をなすように設けられている。このような構成を採用することにより、分離流路が逆流防止弁としての機能を有し、分離効率をさらに向上することができる。試料中の小さいサイズの成分は、図中、黒塗り矢印の向きに移動するが、

黒塗り矢印の反対の向きに移動することは難しい。このため小さいサイズの成分が効率良く流路溝161aから流路溝161bへ移動することになり、分離効率が顕著に向上する。

また図24に、流路溝161aおよび流路溝161bの流れの方法を逆向きとした場合の分離装置の分離流路部分の構造をに示す。この装置では、試料原液が流路溝161aを通り、分離後の試料が流路溝161bを通るようになっている。分離流路は、流路溝161aの流れ方向（図中矢印）に対して鋭角をなすように設けられ、流路溝161bの流れ方向（図中矢印）に対して鈍角をなすように設けられている。流路溝161aおよび流路溝161bの流れの方法を逆向きとした場合もこのような構成を採用することにより、分離効率が顕著に向上する。

#### （第5の実施形態）

本実施形態に係る分離装置の分離流路部分の構造を図17に示す。図17（a）が平面図、図17（b）が断面図である。この装置では、試料原液が流路溝161aを通り、分離後の試料が流路溝161bを通るようになっている。分離流路には断面が楕円形の開口182が設けられている。断面が楕円形の開口182は、たとえば（110）Si基板にウェットエッチングを施すことで形成できる。すなわち、図17において、矢印で示した角度が109.5度となるようにマスクを設計し、（110）Si基板にポジレジストを塗布したのち、同マスクを介して露光することによりマスク形状をレジストに転写する。レジストを現像した後、25% TMAH等を用いた異方性エッチングを施すと（111）面同士の突合せにより狭いスリットを生じる。その基板を、 $\text{HF} + \text{HNO}_3 + \text{CH}_3\text{COOH}$ のような等方性エッチャントでエッチングすることにより、スリットはサイドエッチングを受け、卵円形に近い形状とすることができる。

このような構成を採用することにより、同程度の大きさを持った複数の成分を形状により分離することが可能である。たとえば、球形の成分と球形以外の成分

とを選択的に分離することができる。球形以外の立体構造を持つ物質として、たとえば、精子など扁平楕円型形の物体、寄生虫卵などのラグビーボール型の物体などをあげることができる。

たとえば、開口182の深さを精子頭部の幅に相当する3 $\mu$ m程度とすることができる。さらに開口182の大きさを調整することにより、X精子とY精子との分離も可能となる。さらに、流路溝161aと流路溝161bを流れる液体のpHをそれぞれ異にすることにより、異常精子の混入を防ぐことが可能となる。たとえば、精子の入った原液を流路溝161aに流し、流路溝161bのpHを原液よりも低い値に設定すると、酸性溶液に対する走化性が通常である精子のみを選択的に分離することが可能である。

また、たとえば動物の糞中から、寄生虫卵を選択的に検出することも、本実施形態の構成を用いることにより可能である。

#### (第6の実施形態)

本実施形態に係る分離装置の分離流路部分の構造を図18に示す。図18(a)が平面図、図18(b)が断面図である。この装置では、試料原液が流路溝161aを通り、分離後の試料が流路溝161bを通るようになっている。分離流路として、隔壁165の上部にのみ薄板状の開口182が設けられている。このような開口182は、たとえば次のようにして形成することができる。すなわち、基板166に第1の実施形態と同様にしてウェットエッチング法により流路溝161aおよび流路溝161b、隔壁165を形成する。次いで、隔壁165部分に電子ビーム(EB)露光およびドライエッチングを施して上部に溝を形成する。そして、静電接合などの方法を用いて被覆180を施すことにより、得ることができる。開口182は隔壁165の幅方向の長さに対し、厚さ方向の長さが短い。ため、チューブ状の物質186は分離流路を通過することができるが、球状の物質184は通過することができず、これらを分離することができる。たとえば、

鞭毛やカーボンナノチューブなどのようなチューブ状の物質や、薄板状の物質を他の形状の物質から選択的に分離することが可能となる。

たとえば、カーボンナノチューブとアモルファスカーボンの混合分散液を流路溝 161a に供することにより、カーボンナノチューブのみを選択的に流路溝 161b から回収することが可能である。

また、精子を所定の時間超音波破壊し、頭部と鞭毛部とに切断し、それらの混合物を本実施形態の分離装置に供することにより、遺伝子量の多い頭部のみを短時間で選択的に回収することが可能となる。

#### (第 7 の実施形態)

本実施形態に係る分離装置の分離流路部分の構造を図 19 に示す。この装置では、試料原液が流路溝 161a を通り、分離後の試料が流路溝 161b を通るようになっている。分離流路に凹部としてたとえば隔壁 165 に憩室 188 を有する形状の開口 182 を形成する。ここで、憩室 188 とは、分離流路から分岐した空間であって、所定の大きさ以下の物質のみが進入可能な空間のことを指す。隔壁 165 への憩室 188 の作製は、たとえばフォトリソグラフィーや電子ビーム (EB) リソグラフィなどの方法を用いることができる。あるいは凹部の他の形成方法として、たとえば基板の分離流路部分に、溝を形成することも可能である。

このような構造とすることにより、種々の大きさの成分を含む試料原液から、各成分を順次分取することができる。なぜなら、試料原液が分離流路を通過する際に、小さい分子 151 は憩室 188 に捕獲されるため、通過に要す時間が長いのに対し、中程度の大きさの分子 153 は憩室 188 に捕獲されることなく開口 182 を通過するため、通過に要する時間は短いからである。

#### (第 8 の実施形態)

本実施形態に係る分離装置の分離流路部分の構造を図 7 に示す。この装置では、

試料原液が流路溝 161a を通り、分離後の試料が流路溝 161b を通るようになっている。分離流路の設けられた流路溝 161a の側壁には疎水性膜 171 が形成され、分離流路の設けられた流路溝 161b の側壁には親水性膜 172 が形成されている。このような構成を採用することにより、親水性の物質について、分離流路が逆流防止弁としての機能を有し、分離効率をさらに向上することができる。試料中の親水性成分は、図中、矢印の向きに移動するが、矢印の反対の向きに移動することは難しい。このため親水性成分が効率良く流路溝 161a から流路溝 161b へ移動することになり、分離効率が顕著に向上する。

この装置では、試料を移動させるための外力として圧力を利用しているため、比較的簡素な外力付与装置を設ければ済むので、製造コストの低減、装置の小型化に有利である。

上記本実施形態では、直線流路が平行に形成された例について説明したが、直線状のものに限らず、種々の形状の流路を採用することができる。

たとえば図 13 のような形状とすることもできる。流路の壁 167 によって区画された試料分離部は、流路溝 161a および 161b が隔壁 165 を介して並行して形成された構成となっている。流路溝 161a には試料の入り口 A および出口 A' が設けられ、流路溝 161b には試料の入り口 B および出口 B' が設けられている。

また、図 14 のように渦巻き形状とすることもできる。流路の壁 167 によって区画された試料分離部は、流路溝 161a および 161b が隔壁 165 を介して並行して形成された構成となっている。流路溝 161a には試料の入り口 A および出口 A' が設けられ、流路溝 161b には試料の入り口 B および出口 B' が設けられている。

また図 15 のような構成とすることもできる。この構成では、流路の壁 167 によって区画された試料分離部は、流路溝 161a および 161b が隔壁 165

を介して形成された構成となっている。流路溝 1 6 1 b の部分を除いた試料分離部全体にわたる領域が流路溝 1 6 1 a となっている。流路溝 1 6 1 b には試料の入り口 A および出口 A' が設けられ、流路溝 1 6 1 a には試料の入り口 B および出口 B' が設けられている。

以上の実施形態により、試料の分離、濃縮を容易に行うことができるが、さらに、以下の実施形態により、特定成分の分離とともに、検出や分析を行うことが可能である。

ここでは、例として主に図 5 または図 2 5 の分離流路を用いて説明するが、特定成分の分離、分析、検出に用いる分離流路はこれに限定されない。

#### (第 9 の実施形態)

本実施形態に係る分離方法を、図 2 5 を用いて説明する。図 2 5 は、細胞を用いた特定成分の分離、検出方法について説明した図である。図 2 5 において、隔壁 1 6 5 の開口部は細胞が通過不可能な大きさに形成する。細胞を含む試料原液は、流路溝 1 6 1 a を通るが、試料原液に含まれる細胞は隔壁 1 6 5 を通過することができない。流路溝 1 6 1 a、流路溝 1 6 1 b の流れの向き（図中白抜き矢印）は同方向である。ここで、試料原液を通した後、細胞刺激性物質や、細胞と特異的に反応する物質（図 2 5 においては刺激因子）を流路溝 1 6 1 a に流す。細胞がこの刺激等により特異的に細胞内の物質を細胞外に放出する場合、放出された物質が流路溝 1 6 1 b を通過できるよう隔壁 1 6 5 の開口部を形成することにより、放出された物質を分離、検出することができる。このような構成とすることにより、たとえばアレルギーなどの反応を誘発、抑制、増強、緩和するような物質を簡便に探索することが可能である。

なお、本実施形態においては、必要に応じて試料原液を流路溝 1 6 1 b に流すこともできる。また、流路溝 1 6 1 a、流路溝 1 6 1 b の流れの向きは逆方向とすることもできる。



このような分離装置を用いた分離、検出では、細胞それ自体が放出された物質の分離、検出に対するコンタミネーションとなることを防ぐことができる。

また、このような分離装置を用いた分離、検出では、特定の時系列パターンで細胞を刺激することが可能である。生体内では、細胞は一定濃度の刺激物質に対して反応するケースもあるが、パルス状に繰り返し与えられる刺激物質に対して反応しているケースの方が多い。このような刺激応答性を検出する際に、ディッシュ上で培養している細胞では、何度もディッシュを洗い流しながら刺激する必要がある。また、カラム内にバルクで細胞を培養しておいて、そのカラムに培養液と刺激物質を流す方法では、それが改善されてはいるものの、本発明の分離装置と比較して、大量の試薬、大量の細胞が必要であるため、細胞培養が不可欠である。この分離装置を用いた分離、検出では、微量で精密分離が可能であり、開口部に存在する数十から数百個の細胞があれば十分である。したがって、採取した細胞を培養する必要がない。

#### (第10の実施形態)

本実施形態に係る分離方法を、図5を用いて説明する。図5において、流路溝161aに、隔壁165の開口部を通過することができないビーズを通すことにより、たとえば酵素活性の測定などに用いることができる。ビーズには、たとえばアガロース、セルロース、架橋デキストラン、ポリアクリルアミドなど高分子の多孔性ビーズや、多孔性ガラスなどを用いることができる。このビーズには目的酵素の質および発色剤を充填あるいは固定化などの方法により備えるものとする。さらに、隔壁165の開口部にビーズが拘束される形状に開口部を形成することが好ましい。また、隔壁165の開口部は、目的酵素が通過可能な大きさに形成する。このような構成にすると、流路溝161aに試料原液を通すと、目的酵素が含まれていれば隔壁165を通過した後酵素反応によりビーズが発色するため、ビーズの顕微鏡観察などにより目的酵素の有無が簡単に検知可能である。

ビーズが発色した際には、目的酵素を流路溝 1 6 1 b 側から回収することができる。また、この方法は、酵素－基質の関係だけでなく、抗原－抗体、多糖－レクチンなど、他のリガンド－レセプターの関係でも同様に用いることが可能である。

なお、本実施形態においては、必要に応じて試料原液を流路溝 1 6 1 b に流すこともできる。また、流路溝 1 6 1 a と流路溝 1 6 1 b の向きは同方向とすることもできるし、逆方向とすることもできる。

#### (第 1 1 の実施形態)

本実施形態に係る分離方法を、図 5 を用いて説明する。図 5 において、流路溝 1 6 1 a に、隔壁 1 6 5 の開口部を通過することができない吸着用ビーズを通す。ビーズには、たとえばアガロース、セルロース、架橋デキストラン、ポリアクリルアミドなど高分子の多孔性ビーズや、多孔性ガラスなどを用いることができる。次に、流路溝 1 6 1 b に、目的成分を含む試料原液を通す。ここで、隔壁 1 6 5 の開口部を目的成分が通過できる大きさに形成した場合、隔壁 1 6 5 の開口部を通過した目的分子の一部が流路溝 1 6 1 a においてビーズに吸着される。次いで流路溝 1 6 1 a に目的成分に対する一次抗体を含む溶液を流す。その後、余分な一次抗体を洗浄するため緩衝液などを流路溝 1 6 1 a に流す。次いで、流路溝 1 6 1 a に一次抗体に対する二次抗体を流す。ここで、二次抗体には酵素または基質等を結合させておくと、発色などにより目的成分を簡便に検知することができる。余剰の二次抗体を洗浄するために流路溝 1 6 1 a に緩衝液を流した後、二次抗体に結合させた酵素または基質に対する基質または酵素を含む液体を流すことにより、発色反応などを介して目的成分を検知することができる。このような構成とすることにより、ビーズ中に目的成分が濃縮した状態で存在するため、検出感度が向上する。さらに、一次抗体に直接酵素または基質を結合させておくことにより、上記操作はより簡便なものとなる。発色反応を生じる酵素と基質の組み合わせとして、たとえば、酵素ペルオキシダーゼとその基質である 4 - c l i o

ro-naphtholの組み合わせや、酵素アルカリフォスファターゼとその基質であるnitroblue tetrazoliumおよび5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphateの組み合わせなどを用いることができる。

なお、本実施形態においては、必要に応じて試料原液を流路溝161aに流すこともできる。また、流路溝161aと流路溝161bの向きは同方向とすることもできるし、逆方向とすることもできる。

#### (第12の実施形態)

本実施形態に係る分離方法を、図5を用いて説明する。図5において、隔壁165の開口部に高分子ゲルを充填あるいは固定化する。このとき、高分子ゲルは一般に分子インプリンティング法で用いられる方法に従い、目的分子が捕獲される網目構造を有するように形成する。

分子インプリンティング法は、目的分子にあわせてテーラーメイド的にそれを認識する高分子材料を一段階で合成する方法で、具体的には以下のようにして行う。まず、目的分子を鋳型として、機能性モノマーを共有結合または非共有結合により結合させ、鋳型分子-機能性ポリマー複合体を形成させる。ここで、機能性モノマーとして鋳型分子と結合可能な官能基と、ビニル基などの重合可能な基を有する2官能性以上のモノマーを用いることができる。次に、鋳型分子-機能性モノマー複合体を含む溶液に、架橋剤と重合開始剤を加え、重合反応を行う。そして、鋳型分子を重合したポリマーから除去する。すると、得られたポリマーには、鋳型分子との特異的結合部位が形成される。

得られたポリマーを化学的あるいは物理的な方法で、隔壁165の開口部に充填、固定化する。このような構造を備えた分離装置に、目的分子を含む試料原液を流路溝161aから通す。このとき、目的分子は隔壁165の開口部に充填された高分子ゲルの網目構造に捕獲されるため、高分子ゲル中の液体や溶質あるい

は分散物の拡散係数は低下する。従って、流路間にたとえば電圧を印加しておく  
と、目的分子の高分子ゲルの網目構造への捕獲によりイオンの伝導性が低下し、  
電流量が下がるため、試料原液中に目的物質が存在するかどうかを把握すること  
が可能である。

以上の実施形態において、流路溝は2つまたは3つ以上とすることができる。

また、以上の実施形態において、基板166および隔壁165に、適宜、親水  
性を付与するための表面処理等を行っても良い。たとえば、熱処理により表面に  
熱酸化を形成する、親水基をもつカップリング剤を塗布する等の方法を採用して  
もよい。そのようにすることによって、回収したい成分が、たとえばタンパク質  
などの生体成分である場合、成分の変性を防ぐ効果が発揮されるとともに、装置  
の流路への成分の非特異吸着を抑制することができるため、分離検出感度を向上  
することができる。

以上の実施形態では、隔壁に設けられた分離流路は、一方の流路溝側が他方の  
流路溝側よりも拡大して開口する形状に形成された構成としたが、分離流路の形  
状はこれに限定されるものではない。

分離流路の構成を、一方の流路溝側が他方の流路溝側よりも拡大して開口する  
形状とした場合、試料原液中の特定成分と結合あるいは反応する粒子を分離流路  
部分に効果的に固定することができるので、好ましい。さらに、このような構成  
にすることにより、分離流路に成分の逆流防止弁としての機能も付与されるため、  
分離、検出、濃縮等の操作においてはより好ましい。

また、以上の実施形態において、ビーズや抗体の作製、酵素による検出反応な  
どは、アフィニティークロマトグラフィーやELISA法などで用いられている  
方法によって行うことができる。

(第13の実施形態)

上記実施形態では、分離流路が規則的に形成された隔壁を有するものを示した。

本実施の形態では、これらとは異なる分離装置の一例を示す。

図 2 6 は本実施の形態の分離装置を示す図であり、分図 (a)、(b) はそれぞれ断面図、斜視図である。図 2 6 (a) に示されるように、基板 1 6 6 には二本の流路溝 1 6 1 a、b が設けられ、それらを分けるようにして隔壁 1 6 5 が設けられている。基板 1 6 6 の上には被覆 1 8 0 が配設される。便宜上、被覆 1 8 0 は図 2 6 (b) には示していない。なお、隔壁 1 6 5 は上述の土手部に相当する。

図 2 6 (a) から分かるように、隔壁 1 6 5 と被覆 1 8 0 との間には空間が確保されているため、この空間を介して流路溝 1 6 1 a および 1 6 1 b は互いに連通している。この空間は、上記の分離装置における隔壁に設けられた分離流路に相当する。したがって、例えば流路溝 1 6 1 a に分離対象物質を含む試料を流し、流路溝 1 6 1 b に緩衝液を流すことにより分離操作を実行することができる。なお、この場合、被覆 1 8 0 にはポリジメチルシロキサンやポリカーボネートなどの疎水性材料からなるものを選択することが好ましい。このようにすることにより、各々の流路溝に試料あるいは緩衝液を他の流路溝に浸入させることなく導入することができ、かつ両方の流路溝に試料等が満たされた段階で、上記空間を介して両流路溝内の試料および緩衝液の混和を生じさせることができる。このような効果は、被覆 1 8 0 を取り付けない状態で操作実施することによっても得ることができる。このとき、空気自体が疎水性物質として上記被覆 1 8 0 と同様に機能しているものと考えられる。

また、本実施形態の分離装置を用いる他の分離方法に次のような方法がある。ポリエチレンテレフタレートなどの親水性材料からなる被覆 1 8 0 を本実施形態の分離装置に取り付けた状態で、例えば流路溝 1 6 1 a に試料を流す。このようにすると当該試料は他方の流路溝 1 6 1 b へ浸入する。この浸入の際に、被覆 1 8 0 と隔壁 1 6 5 との間に形成された空間よりも小さなサイズの成分のみが濾しとられるため、分離が実現する。

本実施形態の分離装置は、流路溝 161 a および 161 b を上記の分離装置に比較して広い面積で接続するため、分離効率が向上するという利点を有している。また、細長い物質であっても詰まりにくく、流路間を容易に移動できるため、こうした物質を含む試料の分離に好適に用いることができる。

このような流路溝 161 a、b および隔壁 165 は、例えば (100) Si 基板をウェットエッチング処理することにより得られる。(100) Si 基板を用いた場合、(001) 方向に直交あるいは平行な方向では、図示されるように台形型にエッチングが進行する。そのため、エッチング時間を調節することにより隔壁 165 の高さを調節することが可能である。

また、図 27 に示されるように、隔壁 165 d を被覆 180 上に設けることもできる。このような隔壁 165 d を備えた被覆 180 は、ポリスチレンなど樹脂を射出成形することにより容易に得ることが可能である。また、基板 166 には 1 本の流路をエッチング等により設けるだけでよい。したがって、この分離装置は上記のような簡便なプロセスにより得られるため、大量生産に適している。

#### (第 14 の実施形態)

本実施の形態に係る分離装置の断面図を図 28 に示す。図 28 (a) の分離装置は、流路溝 161 a、161 b および隔壁 165 を備えた基板 166 と被覆 180 とからなっている。基板 166 に関しては、第 1 の実施形態で示したものと同様であるが、本実施形態においては、被覆 180 に疎水性の材料を使用していることが特徴である。

親水性の材料からなる被覆を使用する場合、図 29 (a) のように、一方の流路溝 161 a に試料を導入すると、隔壁 165 に設けられた多数の開口部を介して他方の流路溝 161 b の流路にもその試料が速やかに浸入してしまう。分離を実現するためには、この状態となる前に流路溝 161 b に緩衝液などを流す必要があるため、試料と緩衝液などを同時に導入しなければならないが、このような

操作は通常困難である。

一方、疎水性材料からなる被覆 180 を用いる本実施形態の分離装置においては、以下のような現象が生じることを本発明者らは見出した。すなわち、図 29 (b) において、一方の流路溝 161 a に試料を導入すると、試料は他方の流路溝 161 b に浸入することなく、流路溝 161 a に留まる。さらに、この状態で他方の流路溝 161 b から緩衝液などを流すと、隔壁 165 に設けられた開口部を介して、二本の流路溝 161 a および 161 b 内の液体が混和することが判明した。

上記のような性質を備える本実施形態の分離装置によれば、試料および緩衝液などを同時に導入するという困難な操作が不要となり、確実に分離を実行することが可能となる。

本実施形態の分離装置の被覆 180 の材料としては、ポリジメチルシロキサン (PDMS)、ポリカーボネート、ポリスチレンなどの疎水性樹脂が例示される。また、疎水性の材料を用いた被覆 180 のほか、例えば図 28 (b) のように、被覆 180 の表面にキシレンシラザンなどの疎水性コーティング剤により疎水性のコート層 180 a を設けたものを被覆とすることもできる。

ここで、上述の開口部を介した液体の混和を実現するためには、被覆 180 の疎水性の度合いについて、開口部の径に応じた選択をする必要がある。例えば、開口部の径が 50  $\mu\text{m}$  以上と比較的大きい場合、極めて疎水性の度合いが高い材料である PDMS からなる被覆 180 を用いても上記混和が生じる。しかし、開口部の径が 1  $\mu\text{m}$  以下と小さい場合、PDMS からなる被覆 180 を使用すると上記混和が生じない。この場合、被覆 180 の材料として、疎水性の度合いが PDMS よりも低いポリカーボネートを選択することにより上記混和を生じさせることが可能である。

さらに、上記のような性質を有する分離装置を利用することにより、例えばア

アイソザイム分析を行うことも可能である。アイソザイムとは、由来が異なるが同一の酵素活性を有する酵素群のことをいう。例えば、乳酸脱水素酵素（LDH）には、5種類のアイソザイム（LDH1～5）が存在することが知られており、組織・臓器によってそれらの分布に特徴がある。したがって、どのアイソザイムが上昇しているかを調べることにより病変組織を推測することが可能である。こうした分析はアイソザイム分析と呼ばれる。

通常、アイソザイム分析は、各アイソザイムをゲル上で電気泳動により分離したのち、ゲルごと発色液に浸すことによってバンドを発色させ、各アイソザイムの活性の高低を調査することにより行われている。

こうしたアイソザイム分析を幅100 $\mu$ m程度のマイクロ流路上で実現するには、マイクロ流路中に分離領域を設け、その分離領域で各アイソザイムを分離したのち、当該分離領域に染色液を混和させる必要がある。しかし、染色液をマイクロ流路に導入する際には、分析対象サンプルによりマイクロ流路が満たされた状態となっている。このため、毛細管現象が生じず、染色液をマイクロ流路全体に混和させることは困難である。

本実施の形態の装置を利用すれば、マイクロ流路上でアイソザイム分析を実施することが可能である。以下に図30を参照して分析の手順を説明する。図30

(a)は、分析に用いる分析装置の流路部分の構造を示した図である。この装置は、流路の壁167aおよび167bの間に2本の流路溝161aおよび161bを有し、両者は開口部を有する隔壁165により区切られている。流路溝161aには、図中の斜線で示される分離領域が設けられている。この装置の流路溝161aに分析対象サンプルを図30(b)の矢印方向から導入すると、当該サンプル中に含まれる各アイソザイムが分離され、点線で示されるようなバンドが形成される。なお、この時点では当該バンドを確認することはできない。次に、当該バンドを発色するための発色液を流路溝161bに導入すると、発色液は毛



細管現象により図30(c)中の矢印のように移動し、徐々に流路溝161aへ浸入する。浸入した発色液と各アイソザイムとが反応して発色するが、各アイソザイムは流路溝161aにおいてバンドを形成して存在するため、バンド310として発色し、これを視認することが可能である。各アイソザイムのバンドの位置を予め同定しておけば、各バンドの発色の強弱を観察することにより、どのアイソザイム活性が強いかを瞬時に判断することが可能となる。

流路溝161aに設ける分離領域は、例えばポリアクリルアミドゲルやアガロースゲルなどを流路溝161aに導入することにより調製することができる。この際、上述したように、疎水性の被覆を備えていることから、流路溝161aに導入したゲルは流路溝161bへ漏れ出すことはない。

また、流路溝161aに設ける分離領域として、例えばナノオーダーの柱状体などの微細障害物を多数配設してもよい。これら微細障害物の表面を親水性としてもよい。これにより保水効果が得られるため、試料が流路溝161bに流出することを抑制することができる。

LDHのアイソザイム分析を行う場合、発色液としては、例えば、LDHの基質である乳酸と、ニトロテトラゾリウムブルーを含む発色液を使用することができる。LDHが存在する個所において、酵素反応が進行し、この反応の際に生じる還元性物質がニトロテトラゾリウムブルーを還元することにより青紫色の発色を呈する。

さらに、上記発色をレンズで拡大して直接観察し、どのバンドの発色が最も強いかを判定することができる。また、スキャナーで上記発色パターンをデジタル化し、濃淡パターンを得ることもできる。このパターンを評価することにより、  
診断に有用な情報を得ることが可能となる。

#### (第15の実施形態)

本実施形態に係る分離装置の分離流路部分の構造を図31(a)に示す。本実

施形態に係る分離装置は、第1の実施形態で示した分離装置と同様の構造を有している。すなわち、開口部を有する隔壁165を挟んで二本の流路溝161aおよび161bが設けられた構成である。二本の流路溝のうち、流路溝161bには吸水材300が設けられている。

試料は流路溝161aに導入される。試料が流路溝161aを進行すると同時に、当該試料中に含まれる水分は隔壁165の開口部を通過して流路溝161bへ移動し、流路溝161bに設けられた吸水材300に吸収される。その結果、導入された試料中の含水量が減少する。すなわち、本実施形態の分離装置によれば、試料の濃縮を実現することが可能である。

吸水材300の材料としては、メチルセルロースや酢酸セルロースなどの吸水性ポリマーなどが例示される。吸水材300は例えば次のようにして流路溝161bに導入することができる。吸水性ポリマーを水性ゲルの状態とし、被覆を取り付けない状態で流路溝161bに流し込む。このようにすれば、ゲルは流路溝161aに漏れ出さず、流路溝161bに留まる。この状態でゲルを乾燥させたのち、被覆を分離装置に取り付けることにより、本実施形態の分離装置が得られる。

また、図31(b)のように、3本の流路溝161a、161b、161cを設け、流路溝161bおよび161cにそれぞれ吸水材300a、300bを備えてもよい。この図において、吸水材300aの吸水能力を吸水材300bのそれよりも小さくすることにより、水分は流路溝161cに導かれることになるため、より確実に試料を濃縮することが可能となる。

吸水材300aおよび300bは、上記と同様に吸水性ポリマーのゲルを流路溝に流し込むことにより設けることができる。この際に、流路溝161bに流すゲル中の吸水性ポリマー濃度を、流路溝161cに流すゲル中の吸水性ポリマー濃度よりも低くする設定することにより、吸水材300aの吸水能力を吸水材3

00bのそれよりも小さくすることができる。

(第16の実施形態)

本実施形態に係る分離装置の分離流路部分の構造を図32に示す。この分離装置は、流路の壁167aおよび167bとの間に三本の流路溝161a、161b、161cを有している。流路溝161aおよび161bの間、ならびに流路溝161bおよび161cの間にはそれぞれ開口部を有する隔壁165a、165bが設けられている。165aの開口部は165bのそれよりも大きく設けられている。また、流路の壁167aおよび167bにも、後述の理由により微小な開口部が設けられている。流路の壁167aおよび167bの開口部が設けられた個所に、それぞれ加圧用流路302aおよび302bが接続されている。

次に本実施形態の分離装置を用いた試料の分離について説明する。分離対象の試料は流路溝161bに導入する。また、流路溝161aおよび161bには緩衝液と流す。流路溝161a、161b、161cの開口部が設けられた個所に試料や緩衝液が満たされたら、加圧用流路302aおよび302bにも緩衝液を導入し、圧力301aおよび301bを交互にかける。流路の壁167aおよび167bには前述のように微小な開口部が設けられているため、圧力301aおよび301bは流路溝161a～161cに伝導する。

図の場合では、165aの開口部は165bのそれよりも大きく設けられているため、流路溝161cには小さな分子151が集められ、流路溝161aには小さな分子151および中程度の大きさの分子153が集められる。また、流路溝161bには、他の流路溝に移動できない大きな分子152が高濃度で得られる。以上の分離は、圧力301aおよび302bを加えなくても、自然拡散によりある程度実現するが、圧力301aおよび302bを加えることにより、試料中に含まれる分子に対し、進行方向に垂直な力が加わるため、分子が他の流路溝に移動する機会が顕著に増加する。したがって分離効率が向上することとなる。

圧力 3 0 1 a および 3 0 2 a は、例えばポンプにより付与することができる。また、ポンプのほか、図 3 3 に示すような構成を採用することもできる。加圧用流路 3 0 2 a および 3 0 2 b にそれぞれ電極 3 0 3 a および 3 0 3 b を配設し、電極 3 0 3 a および 3 0 3 b に電源 3 0 4 に電流を流す。これにより電気浸透流 3 0 5 a および 3 0 5 b を発生させることができる。電気浸透流は次のような原理で発生する。流路壁面が酸化ケイ素の場合、酸化ケイ素の等電点は pH 2 ~ 3 であり、それ以上の pH では流路壁面はマイナスに価電されている。そのため、緩衝液中に含まれるプラス価電のイオンが流路壁面に集まることとなる。こうした状態で電場がかけられると、これらプラス価電のイオンにより流路壁面付近でマイナス電極側への流れが生じるため、その流れを補償するために流路中央部ではプラス電極側への流れが生じる。この一連の流れが電気浸透流である。したがって、電源 3 0 4 の電流の向きを周期的に変えることにより、電気浸透流 3 0 5 a および 3 0 5 b を交互に生じさせることができる。

(第 1 7 の実施形態)

本実施形態に係る分離装置の分離流路部分の構造を図 3 4 に示す。この分離装置は、流路の壁 1 6 7 a および 1 6 7 b との間に三本の流路溝 1 6 1 a、1 6 1 b、1 6 1 c を有している。流路溝 1 6 1 a および 1 6 1 b の間、ならびに流路溝 1 6 1 b および 1 6 1 c の間にはそれぞれ開口部を有する隔壁 1 6 5 a、1 6 5 b が設けられている。1 6 5 a の開口部は 1 6 5 b のそれよりも大きく設けられている。

次に本実施形態の分離装置を用いた試料の分離について説明する。分離対象の試料は流路溝 1 6 1 a に導入する。また、流路溝 1 6 1 b には試料よりも浸透圧の高い第一緩衝液 3 3 0 a を流し、流路溝 1 6 1 c には第一緩衝液 3 3 0 a よりもさらに浸透圧の高い第二緩衝液 3 3 0 b を流す。このようにすることによって、図中白抜きの矢印方向、すなわち隔壁 1 6 5 a および 1 6 5 b に垂直な方向への

浸透圧が生じるため、ポンプなどを使用することなく同方向への水の流れを生じせしめることができる。したがって、隔壁165a、165bを通過することのできるサイズの分子については確実に通過させることができることから、顕著に分離能を向上させることが可能となる。例えば図のように、大きな分子152、小さな分子151、中程度の大きさの分子153が含まれる試料を流す場合を考える。小さな分子151および中程度の大きさの分子153のみが隔壁165aを通過することができ、さらに小さな分子151のみが隔壁165bを通過できるように隔壁165a、bの開口部のサイズを設定すれば、小さな分子151および中程度の大きさの分子153をそれぞれ確実に流路溝161cおよび161bに移動させることができる。

第一緩衝液330aおよび第二緩衝液330bについては、前者よりも後者の塩濃度を高くすることで上述の浸透圧を生じさせることができる。また、第一緩衝液330aおよび第二緩衝液330bの塩濃度を同じとし、マンノースなどの糖、線状アクリルアミドポリマー、希薄なアガロスコロイドを添加し、これらの物質の濃度について、第一緩衝液330aよりも第二緩衝液330bの濃度を高くすることによっても上述の浸透圧を生じさせることができる。

#### (第18の実施形態)

本実施形態に係る分離装置の分離流路部分の構造を図35(a)に示す。この分離装置は、流路の壁167aおよび167bとの間に三本の流路溝161a、161b、161cを有している。流路溝161aおよび161bの間、ならびに流路溝161bおよび161cの間にはそれぞれ開口部を有する隔壁165a、165bが設けられている。ここで、後述の理由により流路溝161bは他の流路溝よりも狭く、例えば1~10 $\mu$ m程度である。さらに、流路溝161bには高分子ゲル膜340が設けられる。高分子ゲル膜340は、1nmサイズの孔を多数有する。

現在のナノ加工技術では、1 nmサイズの孔を設けることは困難である。そこで、本実施形態の分離装置においては、この孔を、流路溝161aおよび161bに連通する分離流路として利用するものである。

次に本実施形態の分離装置を用いた試料の分離について説明する。分離対象の試料は流路溝161aに導入する。また、流路溝161cには緩衝液を流す。試料中に含まれる1 nm以下の物質のみが高分子ゲル膜340を通過することができることから、当該1 nm以下の物質を試料から分離することが可能となる。

高分子ゲル膜340は、次のように調製することができる。所定の濃度の高分子ゾルを流路溝161bに流し込む。このとき、流路溝161bを被覆などで覆わない状態とする。このようにすれば、高分子ゾルは流路溝161aあるいは161cに溢れ出すことなく、流路溝161bに留まる。この状態で放置することにより、高分子ゾルはゲル化して高分子ゲル膜340を形成する。高分子ゲルとしては、ポリアクリルアミド、メチルセルロース、アガロースなどが例示される。

本実施形態の分離装置により、例えば1 nmという極めて小さなタンパク質の分離も可能となる。また、タンパク質のみならず、イオン等を分離することも可能である。したがって、本実施形態の分離装置を脱塩の目的で利用することもできる。

高分子ゲル膜は、次のようにしても調製することができる。(図35(b)参照) 図35(a)と異なり隔壁が1つの場合でも、一方の流路にポリマーの原材料である低分子材料341を流して充填した後、他方にその重合を開始する重合剤342を流すと、隔壁に沿って高分子ゲル膜340が形成される。高分子ゲル膜が形成された後は高分子ゲル膜自体が低分子材料および重合剤の浸透を妨害するため、薄いまま維持される。高分子ゲル膜が形成された後、両側の流路を洗浄し低分子材料および重合剤を除去することで、小さな分子のろ過に適した隔壁が実現できる。

高分子ゲルとして、ポリアクリルアミドを用いる場合、低分子材料としてNN'-メチレンビスアクリルアミド含有アクリルアミド（ビスアクリルアミド1 gに対してアクリルアミド3.9 gの割合で蒸留水に溶かし、溶質全体の重量%が2.5%程度になるように調製）、重合剤として過硫酸アンモニウム（5～20重量%程度になるよう調製）を用いることができる。

なお、高分子ゲル膜340以外の多孔質体として、ケイ酸ナトリウム水溶液（水ガラス）を焼結して得られる多孔質膜、また、例えば水酸化アルミニウムゾルや水酸化鉄コロイドゾルなどのコロイド粒子を焼結して得られる多孔質膜を採用してもよい。

さらに、ナノオーダーの孔を備える隔壁は、以下のような方法で設けることも可能である。図36および37を参照して説明する。まず、図36（a）のように、ガラスあるいは石英などの絶縁性の基板166に流路350を形成する。次に、図36（b）に示されるように、流路350の中央付近のみが開いたフォトレジストパターン351を形成したのち、図36（c）のように、アルミニウムをスパッタ法による成膜、もしくは蒸着などにより数 $\mu$ m厚の隔壁165およびアルミニウム層352を形成する。さらに、アルミニウム層352をダマシンプロセスにより削り取り、続いてフォトレジストパターン351を除くことにより、図36（d）のように流路350内にアルミニウム製の隔壁165を備えた基板166が得られる。隔壁165の高さは流路350の深さと同じとする。

続いて、図37（e）のように、電極353を隔壁165に接触させ、かつ流路350の流れの方向に沿って電極353を基板166に押し当てる。なお、電極353の下面で流路350に面した部分の片側は絶縁層356を構成する。図37（e）では酸化膜を設けた場合を示しているが、特に何も形成せず空気で絶縁する構成としてもよい。

次に、図37（f）のように一方の、絶縁層356が形成される側の流路に硫

酸などの電解質液 354 を導入し、その流路端に電極を電解質液に浸すようにして配置する。図に示すように絶縁層 356 として酸化膜を形成した場合は電解質液 354 は流路 350 を完全に満たしていてもよいが、特に何も形成しない構成の場合は、電解質液 354 は流路 350 を完全には満たさず、電極 353 の下面との間に空気の層ができる構成とする。この場合空気の層が絶縁層 356 を構成することになる。電極 353 をプラス極、前記流路端に設けた電極をマイナス極にして電圧を印加し陽極酸化を行う。酸化は電流が停止するまで行う。その結果、図 37 (g) のように、アルミニウム酸化物からなる隔壁 165 d が得られる。そして、もう一方の流路に塩酸を導入し、酸化されずに残ったアルミニウムを溶解除去する。その後、図 37 (h) のように被覆 180 を基板 166 に取り付けて分離装置を得る。

図 37 (g) 中のアルミニウム酸化物からなる隔壁 165 d を拡大した図を図 38 に示した。図示されるように、この隔壁は、試験管状の凹部 355 が規則正しく形成されたアルミニウム酸化膜である。このアルミニウム酸化膜は、0.1 nm オーダーの隙間の格子を持つことから、イオンのみを通過させることができる。

また、上記では、図 37 (f) に示されるように、一方の流路にのみ電解質液 354 を導入した状態で陽極酸化を行ったが、両方の流路に電解質液を導入して陽極酸化を行うと、隔壁に貫通孔を形成させることができる。こうして得られる貫通孔は 1 ~ 4 nm のサイズを有するため、このような隔壁を備えた分離装置は、タンパク質の分離の目的に好適に用いることができる。

#### (第 19 の実施形態)

本実施形態に係る分析システムの構成を図 39 に示す。図 39 (a) は本実施形態の質量分析システム (MS 分析装置) の基本構成を示す図である。本実施形態の分析システムは、注入部、イオン化部、分析部、検出部および解析部を備え



た分析装置に、例えば上記実施形態のいずれかの分離装置が組み込まれて成っている。分析対象の試料は、上記分離装置に導入されて被検出成分と不要成分とに分離される。この被検出成分は上記分析装置の注入部に導入され、イオン化部に送られてイオン化される。イオン化された被検出成分は図のように順次、分析部、検出部で分析・検出される。こうして得られたデータは解析部にて解析され、当該解析データがアウトプットされる。

また、図39(a)における被検出成分および注入部の部分の構成をそれぞれ図39(b)および(c)の如く置換することにより、GC-MS分析装置およびLC-MS分析装置とすることができる。図39(c)においては、比較的多くの被検出成分をLC装置に供する目的でリザーバーを設けているが、必ずしも備える必要はない。また、図39(b)においてはリザーバーを設けていないが、GC部の前にリザーバーを設けてもよい。

上記試料は特に限定されないが、例えば血液、組織抽出物などを挙げることができる。

#### (第20の実施形態)

本実施形態に係る分析システムの構成を図40に示す。図40(a)は本実施形態の臨床検査システムの基本構成を示す図である。本実施形態の臨床検査システムは、例えば上記実施形態のいずれかの分離装置、反応部および検出測定部を備えた分析チップを、解析部が設けられた専用の装置にはめ込んで使用する。分析対象の試料は上記分離装置に導入されて被検出成分と不要成分とに分離される。この被検出成分は反応部に送られ、試薬保持部から供給された試薬と混和される。この反応部における反応結果は検出測定部にて検出・測定される。こうして得られたデータが解析部で解析され、その結果がアウトプットされる。

ここで、上記反応部における反応が、例えば発色反応や発光反応であり、目視にて検出・測定が可能である場合には、検出測定部を省略することができる。ま

た検出測定部は必ずしも分析チップに備える必要はなく、例えば解析部とともに上記専用の装置に設けることもできる。また試薬保持部、および不要成分溜めもまた必ずしも分析チップに備える必要はなく、例えばチューブ等を介して外部に置くこともできる。

また、複数の測定項目を同時に分析するために、図40（b）のように分注部を設けてもよい。

さらに、図40（c）に示されるように、上記分離装置で分離された複数の被検出成分をさらに分離するためのクロマト部を設けてもよい。このような臨床検査システムにより、例えば上述のアイソザイム分析を実行することが可能となる。

#### 〔実施例1〕

図20に示した分離装置を作製し、血液成分の分離を行った。

本実施例においては、Si基板として（110）Si基板を用いた。（110）Si基板上に、フォトリソグラフィーおよびTMAH（テトラメチルアンモニウムハイドロキサイド）を用いた異方性エッチングを施した。エッチングは25% TMAHを用いて2回行い、条件は、1回目が90℃20分、2回目が60℃20分とした。

なお、今回用いた方法では2回目のエッチング時間を増減することにより、開口の大きさを数μmから数十μmまで制御することが可能である。

エッチング後、90℃20分の濃硝酸処理によりシリコン表面に薄い酸化膜を形成した。これによりシリコン基板表面は親水性となり、水が流入可能となった。基板表面は、血液中の成分の非特異吸着を抑制するため、リピジュア（日本油脂社製、登録商標）の100倍希釈液でコートした後、エアガンで乾燥させた。

得られた分離装置の構造を図20に示す。分離装置の大きさは約3cm×1cmである。幅100μm×深さ20μmの並走するの2本の流路（流路1および流路2）と、その流路を隔てる隔壁とから成る。隔壁には、流路1側からロート

状の切れ込みによる分離流路が設けられ、その先端で流路2と連通している。

また、図21は、隔壁の走査型電子顕微鏡（SEM）写真である。図21（C）の平面図を矢印の方向から観察したところ、図21（A）の開口が観察された。分離操作時は、液だめ部分を除く流路の上面を、ガラスを被覆として静電接合により閉じて用いた。

以上により得られた分離装置を用いて、マウスの血液を分離した。ここで、血液はpH7.2のPBS、すなわち $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ を1.83gと、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ を0.2gと、NaClを9gとを水1000mlに溶解したもの、により10倍希釈したものをを用いた。

分離装置に形成した2つの流路のそれぞれに、マウスの血液をロードし、血漿成分の分離を試みた。すなわち、

A：図21の流路2にPBSにより10倍希釈した血液をロード、流路1にPBSをロード

B：図21の流路2にPBSをロード、流路1にPBSにより10倍希釈した血液をロード

である。従って、Aでは流路2から隔壁を通過した血漿成分が流路1へ分離され、Bでは流路1から隔壁を通過した血漿成分が流路2側へ分離される。その際の、血球の隔壁通過による漏出を指標として、A、Bそれぞれの分離能を調べた。

結果を図22に示す。図22（a）は上記Aの結果、図22（b）は上記Bの結果である。A、Bともに血液の流入は毛細管現象によって自動的に起こり、血液の移動速度は約 $400\mu\text{m}/\text{s}$ 、血球の移動速度はともに約 $4600\text{個}/\text{s}$ であった。分離に要した時間はこの毛細管現象による流入時間である2秒間だけであった。図22は、血液をロードした後の分離状態を観察した光学顕微鏡写真である。A、Bとも、マウス血液を導入した流路には、血球の流れが流路に沿った多数のスジとして観察されている。

Aでは流路2から流路1への血球の漏出はまったく認められなかった。すなわち、隔壁の開口部を通過した血球は0個であった。これより、血液から血漿成分のみを選択的に分離、回収することできた。

一方、Bではごく一部の血球が流路1から隔壁の開口部を通過し、流路2に血球が漏出していることが確認された。流路2に血球が流入した速度は10個/秒であり、流路1での血球の移動速度の0.2%だった。図22では、漏出した血球が隔壁面に沿って帯状に観察された。流路1と流路2とを連結する開口部の穴は、粒径が最大で6  $\mu\text{m}$ であったことから、約8  $\mu\text{m}$ の大きさである赤血球のごく一部は変形し、通過したものと考えられる。赤血球は、同じ開口部をAでは通過せず、Bでは通過したことから、このような形状の開口を設けることによる分離流路が逆流防止弁として働き、一方通行効果をもつことが確かめられた。

また、Aの方法で分離を行った後の流路2から回収された液を尿検査試験紙オーションスティック（アークレイ社製）のブドウ糖試験紙およびタンパク質試験紙に接触させたところ、図23に示すようにブドウ糖試験紙は茶色、タンパク質試験紙は緑色に発色した。一方、分離前の血液（10倍希釈）を試験紙に接触させたところ、全体が赤色に染まり、ブドウ糖やタンパク質に特有の発色を検出することができなかった。この結果は、流路2に血漿成分が選択的に分離されたことを示す。したがって、本実施例では比色検出により、血漿成分の分離が容易に確認できた。

以上の結果から、血液中の血球成分と血漿成分とを、外力を使わず毛細管現象と拡散によって、短時間での分離が可能であることが確かめられた。なお、以上の結果から、変形可能な成分では、そのやわらかさと空間形状による必要なエンタルピー増加量の差に応じて開口部を通過できる方向が決まるものと推察される。

#### 〔実施例2〕

本実施例においても実施例1と同様に、Si基板として(110) Si基板を

用いた。(110) Si 基板上に、厚さ35 nmのシリコン酸化膜、厚さ55 nmのカリックスアレーン電子ビームネガレジストを形成した。流路1および流路2の2本の流路が、隔壁に設けられた開口部によって接続する構造とした。ここで、隔壁部は図1に示された形状とした。上記流路1は図1中の流路溝161a、上記流路2は図1中の流路溝161bに相当している。電子ビームを用いて試料の流路となるアレー領域を露光した。キシレンを用いて現像を行い、イソプロピルアルコールによりリンスした。

次に、シリコン酸化膜を $\text{CF}_4$ 、 $\text{CHF}_3$ の混合ガスを用いてRIEエッチングした。レジストを有機溶媒により洗浄除去した後、酸化プラズマ処理を行った。次いで、シリコン基板を、 $\text{HBr}$ ガスを用いてECRエッチングしたところ、エッチング後のシリコン基板の膜厚、すなわち図1におけるDが400 nmとなった。そして、 $\text{BHF}$ （バッファードフッ酸）でウェットエッチングを行い、シリコン酸化膜を除去した。

以上のようにして得られた分離装置の分離流路は、図1に示す概略構造であり、流路1および流路2の幅、すなわち図1におけるWが100  $\mu\text{m}$ であり、分離流路の幅、すなわち図1におけるd1が100 nmであった。

このようにして得られた分離装置を用いて核酸の分離を行った。被分離試料として、100 bpおよび10 kbpの大きさの核酸をそれぞれ含む溶液を用いた。この試料溶液を流路1に導入し、毛細管現象により流路中を移動させた。同時に流路2にもキャリア溶媒を導入し、毛細管現象により流路中を移動させた。

流路2から回収した液を分析した結果、100 bpの核酸のみが検出された。この結果から、試料溶液に含まれる成分のうち、100 bpの大きさの核酸のみが分離流路を通過し、選択的に回収されていることが確かめられた。

本実施例においては、核酸を用いた分離を行ったが、本発明の分離装置を用いることにより、同様にしてタンパク質を分離することもできる。

また、本実施例においては、流路に外力を付与せず、毛細管現象により分離を行った。分離流路を通過しにくい成分に対しては、分離流路の方向、すなわち分離流路の幅に垂直な方向に、たとえば電圧を印加することなどにより、分離効率を高めることができる。

#### 産業上の利用可能性

本発明によれば、試料を、簡単な操作で効率よく分離する分離装置が実現される。特に、生体由来物質を含む試料を、簡単な操作で、成分を変性させることなく高効率で分離する技術が実現される。また本発明により、従来、複数の分離手法を用いて分離・精製していた試料を、一つの装置により多段階で分離する分離技術が実現される。

さらに本発明によれば、従来技術では実現できなかった様々な分離手法が実現される。

## 請求の範囲

1. 被分離試料となる流体の通過する第一の流路溝と、前記流体から分離された特定成分を含む流体の通過する第二の流路溝と、前記第一および第二の流路溝を隔てる隔壁と、が設けられた基板を備え、

前記隔壁に、前記第一および第二の流路溝に連通し前記第一の流路溝を通過する前記流体に含まれる特定成分のみが通過可能な複数の分離流路が設けられたことを特徴とする分離装置。

2. 請求の範囲第1項に記載の分離装置において、前記第二の流路溝に隣接し、前記第二の流路溝を通過する流体から分離された特定成分を含む流体の通過する第三の流路溝と、前記第二および第三の流路溝を隔てる隔壁と、が前記基板にさらに設けられ、

前記隔壁に、前記第二および第三の流路溝に連通し、前記第二の流路溝を通過する流体に含まれる特定成分のみが通過可能な複数の分離流路が設けられたことを特徴とする分離装置。

3. 複数の流路溝が設けられた基板を備え、該複数の流路溝のいずれかの部分に試料の導入口が設けられ、隣接する流路溝間に介在する隔壁に、各流路溝に連通し前記試料に含まれる特定成分のみを通過させる複数の分離流路が設けられたことを特徴とする分離装置。

4. 請求の範囲第3項に記載の分離装置において、前記流路溝が三以上設けられたことを特徴とする分離装置。

5. 請求の範囲第1項乃至第4項のいずれかに記載の分離装置において、複数の前記分離流路は、所定の大きさ以下の成分のみが通過可能に形成されたことを特徴とする分離装置。

6. 請求の範囲第1項乃至第5項のいずれかに記載の分離装置において、複数の

の前記分離流路は、略同一の断面形状および略同一の断面積を有することを特徴とする分離装置。

7. 請求の範囲第1項乃至第6項のいずれかに記載の分離装置において、前記分離流路は、基板表面に形成された溝状の流路であることを特徴とする分離装置。

8. 請求の範囲第1項乃至第7項のいずれかに記載の分離装置において、各流路溝の内部に充填される流体に外力を付与する外力付与手段をさらに備えたことを特徴とする分離装置。

9. 請求の範囲第8項に記載の分離装置において、前記外力付与手段は、一の流路溝における流体の流れ方向と、該流路溝に隣接する流路溝における流体の流れ方向とが、互いに逆方向となるように外力を付与することを特徴とする分離装置。

10. 請求の範囲第1項乃至第9項のいずれかに記載の分離装置において、前記分離流路は、一方の流路溝側が他方の流路溝側よりも拡大して開口する形状に形成されたことを特徴とする分離装置。

11. 請求の範囲第1項乃至第10項のいずれかに記載の分離装置において、前記分離流路は、一方の流路溝側から他方の流路溝側に向けてテーパ状に形成されたことを特徴とする分離装置。

12. 請求の範囲第1項乃至第11項のいずれかに記載の分離装置において、前記分離流路は、前記分離流路と連通する一方の流路溝における流体の流れ方向に対して鋭角をなすように設けられ、他方の流路溝における流体の流れ方向に対して鈍角をなすように設けられたことを特徴とする分離装置。

13. 請求の範囲第1項乃至第12項のいずれかに記載の分離装置において、前記分離流路の内壁に凹部を設けられたことを特徴とする分離装置。

14. 請求の範囲第1項乃至第13項のいずれかに記載の分離装置において、前記流路溝および分流路溝は、エッチングにより形成された溝であることを特徴



とする分離装置。

15. 請求の範囲第1項乃至第14項のいずれかに記載の分離装置において、一の流路溝の内壁が親水性表面を有し、該流路溝に隣接する流路溝の内壁が疎水性表面を有することを特徴とする分離装置。

16. 請求の範囲第1項乃至第15項のいずれかに記載の分離装置において、前記流体に対して、前記流路溝の進行方向とは異なる方向の圧力を加えるための加圧手段をさらに設けたことを特徴とする分離装置。

17. 請求の範囲第1項乃至第16項のいずれかに記載の分離装置において、前記基板を覆う被覆がさらに設けられ、前記被覆の表面が疎水性表面であることを特徴とする分離装置。

18. 請求の範囲第1項乃至第17項のいずれかに記載の分離装置であって、前記流路溝のうち少なくとも一つの流路溝に、前記被分離試料を分離する分離領域がさらに設けられたことを特徴とする分離装置。

19. 複数の流路溝およびこれらの流路溝のうち、互いに隣接する流路溝の間に介在する隔壁を備え、該隔壁に、前記互いに隣接する流路溝に連通する複数の分離流路が設けられた分離装置であって、前記流路溝のうち少なくとも一つの流路溝に、吸水材を配設したことを特徴とする分離装置。

20. 複数の流路溝およびこれらの流路溝のうち、互いに隣接する流路溝の間に介在する隔壁を備え、該隔壁に、前記互いに隣接する流路溝に連通する複数の分離流路が設けられた分離装置であって、前記流路溝のうち、互いに隣接する少なくとも二つの流路溝に吸水材を配設し、各々の流路溝に配設された吸水材の吸水能力が互いに異なり、当該吸水能力の序列に基づき、前記吸水材が配設された流路溝が配置されたことを特徴とする分離装置。

21. 流路溝が設けられた基板を備える分離装置であって、前記流路溝底面上に、前記流路溝を分割するように前記流路溝の進行方向に沿って土手部が設けら

れ、前記土手部の高さが前記流路溝の深さよりも低いことを特徴とする分離装置。

22. 流路溝が設けられた基板と、その基板を覆う被覆を備える分離装置であって、前記被覆の面のうち、前記基板側の面上に、前記基板と前記被覆と当接した状態で前記流路溝を分割するように、土手部が設けられ、前記土手部の高さが前記流路溝の深さよりも低いことを特徴とする分離装置。

23. 請求の範囲第1項乃至第22項のいずれかに記載の分離装置において、前記分離流路が陽極酸化法により設けられたことを特徴とする分離装置。

24. 請求の範囲第1項乃至第22項のいずれかに記載の分離装置において、前記隔壁が、陽極酸化法により酸化され、多数の凹部が設けられた金属膜であることを特徴とする分離装置。

25. 基板と、その基板上に設けられた第一の流路溝と、その第一の流路溝に隣接して前記基板上に設けられた第二の流路溝と、その第二の流路溝に隣接して前記基板上に設けられた第三の流路溝と、前記第一の流路溝と第二の流路溝との間に設けられ、複数の開口部を有する隔壁と、前記第二の流路溝と第三の流路溝との間に設けられ、複数の開口部を有する隔壁と、を備え、前記第二の流路溝内に多孔質体が充填されたことを特徴とする分離装置。

26. 特定成分を検出するための分析システムであって、請求の範囲第1項乃至第25項のいずれかに記載の分離装置と、当該分離装置により分離された前記特定成分を検出するための検出部と、を含むことを特徴とする分析システム。

27. 基板表面に、所定の形状にパターンニングされたマスクを設ける工程と、該マスクを利用して前記基板表面をエッチングし、複数の流路溝および隣接する流路溝に連通する複数の分離流路を形成する工程と、を含むことを特徴とする分離装置の製造方法。

28. 第一の流路、第二の流路およびこれらの流路の間に介在する隔壁を備え、該隔壁に、前記第一および第二の流路に連通する複数の分離流路が設けられた分

離装置を用い、被分離試料となる流体から特定成分を分離する方法であって、

被分離試料となる流体を前記第一の流路中で移動させ、前記被分離試料に含まれる特定成分を、前記分離流路を介して前記第二の流路に移動させるステップを含むことを特徴とする分離方法。

29. 請求の範囲第28項に記載の分離方法において、複数の前記分離流路は所定の大きさ以下の成分のみが通過可能に形成されていることを特徴とする分離方法。

30. 請求の範囲第28項または第29項に記載の分離方法において、前記特定成分がタンパク質またはDNAであることを特徴とする分離方法。

31. 第一の流路、第二の流路およびこれらの流路の間に介在する隔壁を備え、該隔壁に、前記第一および第二の流路に連通する複数の分離流路が設けられた分離装置を用い、被分離試料となる流体から特定成分を分離する方法であって、

前記被分離試料となる流体と、前記被分離試料となる流体に含まれる特定成分と反応して反応生成物を放出する反応性粒子と、を前記第一の流路中で移動させるステップと、

前記特定成分と前記反応性粒子とを反応させ、前記反応性粒子から前記反応生成物を放出させるステップと、

前記反応生成物を、前記第一の流路または前記第二の流路を介して回収するステップと、を含むことを特徴とする分離方法。

32. 第一の流路、第二の流路およびこれらの流路の間に介在する隔壁を備え、該隔壁に、前記第一および第二の流路に連通する複数の分離流路が設けられた分離装置を用い、被分離試料となる流体から特定成分を分離する方法であって、

前記被分離試料となる流体に含まれる特定成分と反応して反応生成物を放出する反応性粒子を前記第一の流路中に導入し、前記分離流路中に固定するステップと、

前記被分離試料となる流体を、前記第二の流路および前記分離流路中で移動させるステップと、

前記被分離試料に含まれる前記特定成分と前記反応性粒子とを反応させ、前記反応性粒子から前記反応生成物を放出させるステップと、

前記反応生成物を、前記第一の流路または前記第二の流路を介して回収するステップと、を含むことを特徴とする分離方法。

33. 請求の範囲第31項または第32項に記載の分離方法において、前記反応性粒子が細胞であることを特徴とする分離方法。

34. 請求の範囲第31項または第32項に記載の分離方法において、前記反応性粒子が高分子ビーズまたはガラスビーズと、前記特定成分に対する酵素あるいは基質とを含むことを特徴とする分離方法。

35. 請求の範囲第31項乃至第34項のいずれかに記載の分離方法において、前記反応が発色反応であることを特徴とする分離方法。

36. 第一の流路、第二の流路およびこれらの流路の間に介在する隔壁を備え、該隔壁に、前記第一および第二の流路に連通する複数の分離流路が設けられた分離装置を用い、被分離試料となる流体から特定成分を分離する方法であって、

前記被分離試料となる流体と、前記被分離試料となる流体に含まれる特定成分と特異的に結合する結合性粒子と、を第一の流路中で移動させるステップと、前記特定成分を前記結合性粒子に結合させるステップと、前記特定成分を前記結合性粒子から脱離させ、第一の流路または第二の流路を介して回収するステップと、を含むことを特徴とする分離方法。

37. 第一の流路、第二の流路およびこれらの流路の間に介在する隔壁を備え、該隔壁に、前記第一および第二の流路に連通する複数の分離流路が設けられた分離装置を用い、被分離試料となる流体から特定成分を分離する方法であって、

前記被分離試料となる流体に含まれる特定成分と特異的に結合する結合性粒子を前記第一の流路中に導入し、前記分離流路中に固定するステップと、

前記被分離試料となる流体を前記第二の流路および前記分離流路中で移動させ、前記被分離試料となる流体に含まれる前記特定成分を前記結合性粒子に結合させるステップと、

前記特定成分を前記結合性粒子から脱離させ、前記第一の流路または前記第二の流路を介して回収するステップと、  
を含むことを特徴とする分離方法。

38. 請求の範囲第36項または第37項に記載の分離方法において、前記特定成分と、前記特定成分と特異的に結合する結合性粒子との結合が、抗原-抗体、酵素-基質、糖鎖-レクチン、染色体またはヌクレオチド鎖-ヌクレオチド鎖、のいずれかによるものであることを特徴とする分離方法。

39. 請求の範囲第36項乃至第38項のいずれかに記載の分離方法において、前記特定成分と特異的に結合する結合性粒子が発色するステップを含むことを特徴とする分離方法。

40. 請求の範囲第28項乃至第39項のいずれかに記載の分離方法において、前記被分離試料が生体由来試料または該生体由来試料の処理物であることを特徴とする特定成分の分離方法。

41. 複数の流路およびこれらの流路のうち、互いに隣接する流路の間に介在する隔壁を備え、該隔壁に、前記互いに隣接する流路に連通する複数の分離流路が設けられた分離装置を用い、被分離試料となる流体から特定成分を分離する方法であって、

被分離試料となる流体を前記いずれかの流路中で移動させ、前記被分離試料に含まれる特定成分を、前記分離流路を介してその他の流路に移動させるステップと、前記流体に、前記流路の進行方向とは異なる方向の圧力を加えるステップと

を含むことを特徴とする分離方法。

4 2. 請求の範囲第 4 1 項に記載の分離方法において、前記流路の進行方向とは異なる二方向の圧力を、所定の間隔で交互に加えることを特徴とする分離方法。

4 3. 請求の範囲第 4 1 項または第 4 2 項に記載の分離方法において、前記圧力を電気浸透流を用いて加えることを特徴とする分離方法。

4 4. 請求の範囲第 4 1 項に記載の分離方法において、前記圧力が浸透圧であることを特徴とする分離方法。

4 5. 請求の範囲第 1 8 項に記載の分離装置を用い、被分析試料を分析する方法であって、該被分析試料を前記分離領域が設けられた流路溝に導入し、該流路溝において前記被分析試料を分離する第一ステップと、前記分離領域が設けられた流路溝に隣接する流路溝に前記被分析試料を検出するための検出試薬を含む流体を導入する第二ステップと、を含むことを特徴とする分析方法。

4 6. 請求の範囲第 4 5 項に記載の分析方法において、前記被分析試料が、複数のアイソザイムを含有することを特徴とする分析方法。

4 7. 請求の範囲第 2 項に記載の分離装置を用いた分離方法であって、

前記第二の流路溝に、前記被分離試料となる流体より浸透圧の高い流体を通過させ、

前記第三の流路溝に、前記第二の流路溝に通過させる流体より浸透圧の高い流体を通過させることを特徴とする分離方法。

☒ 1

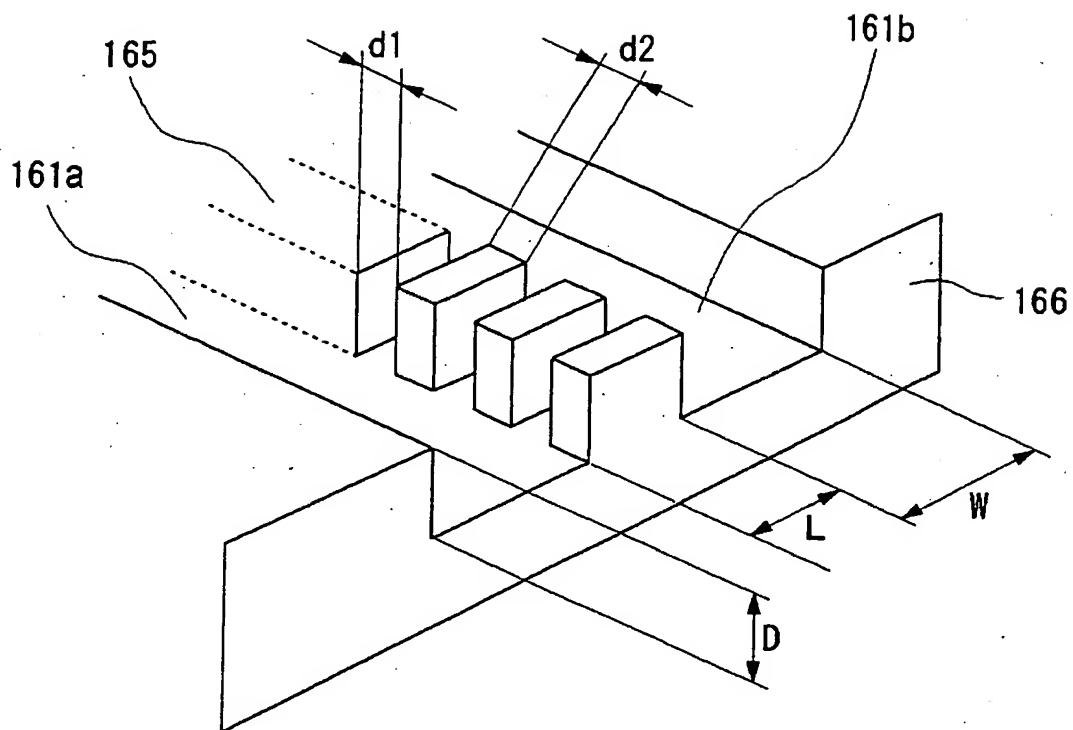


図 2

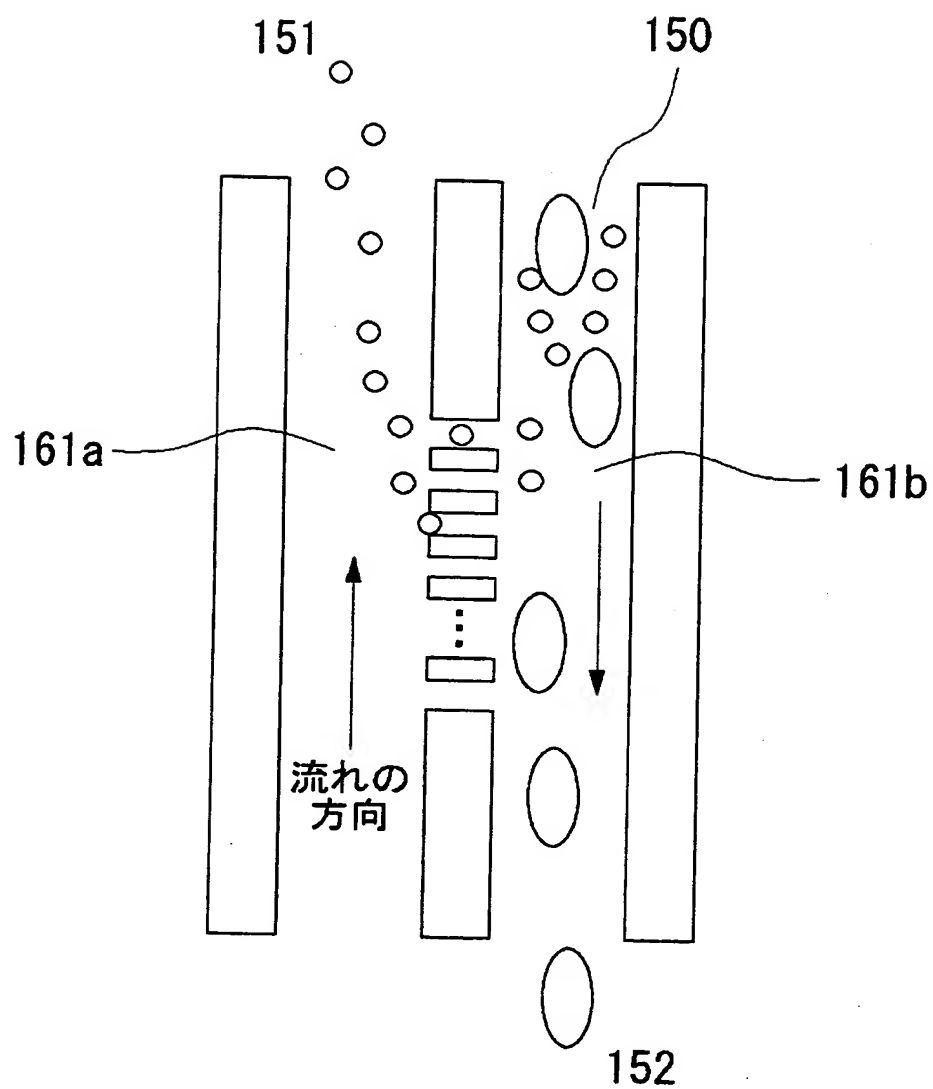




図 3

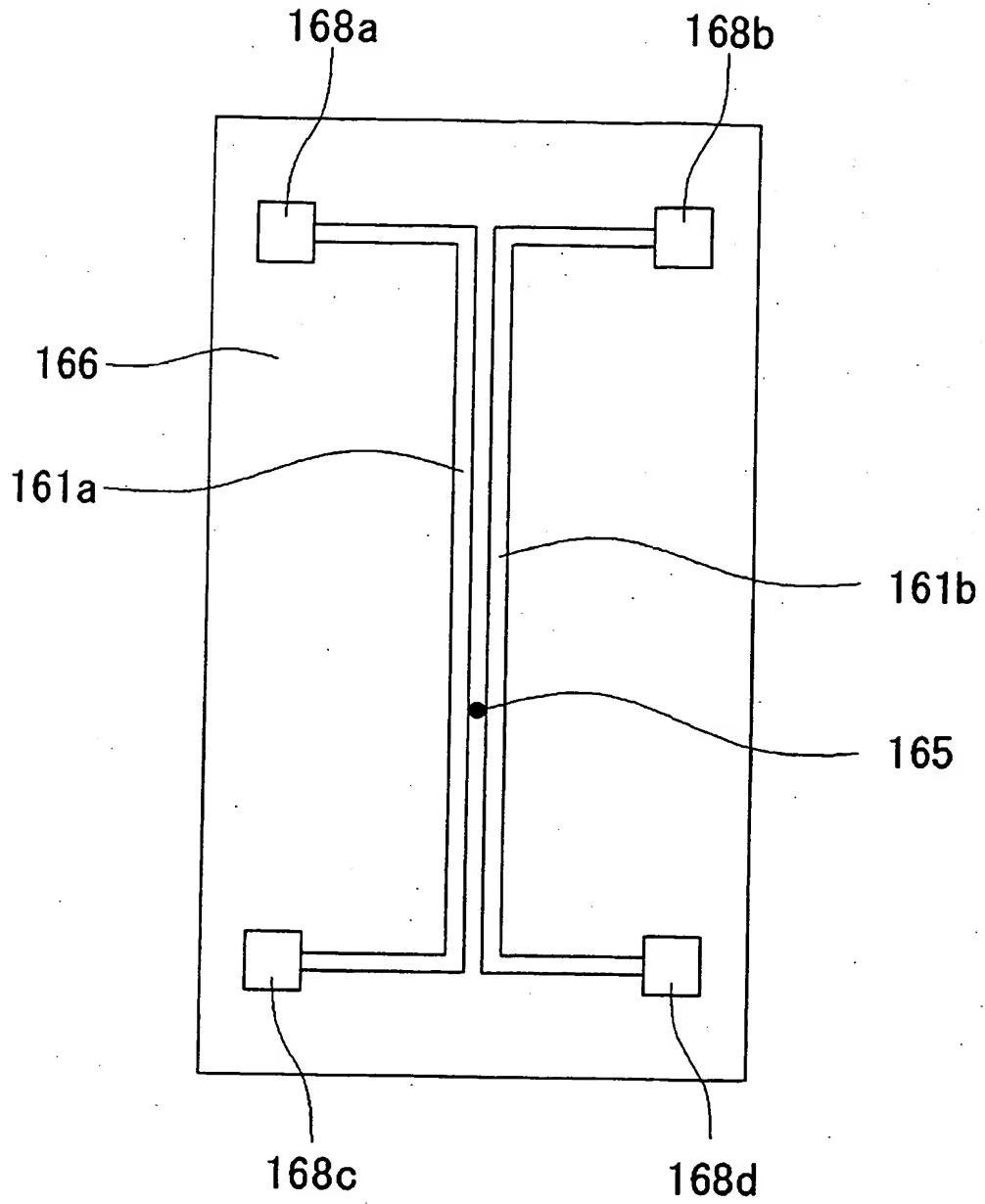


図 4

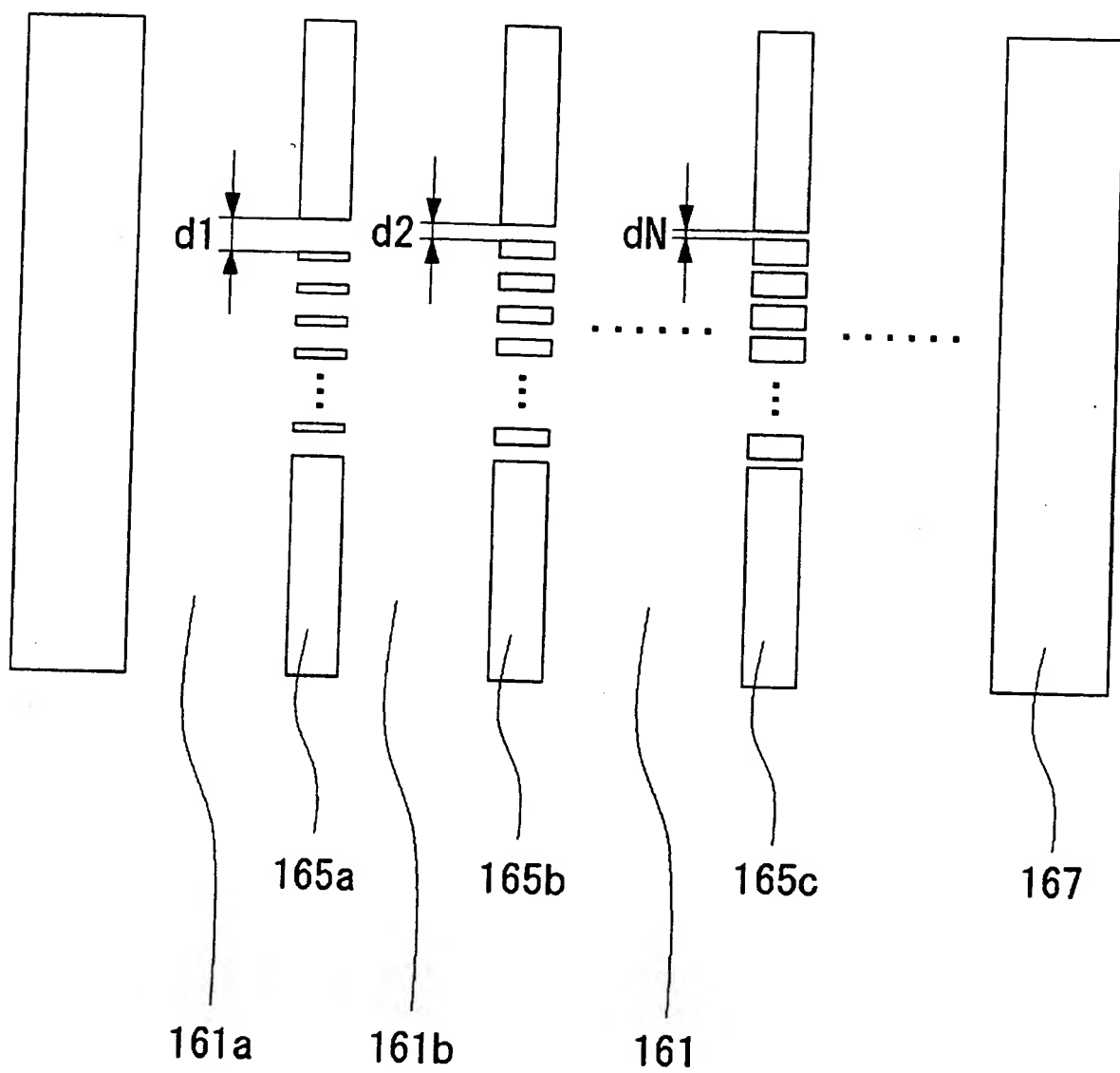


図 5

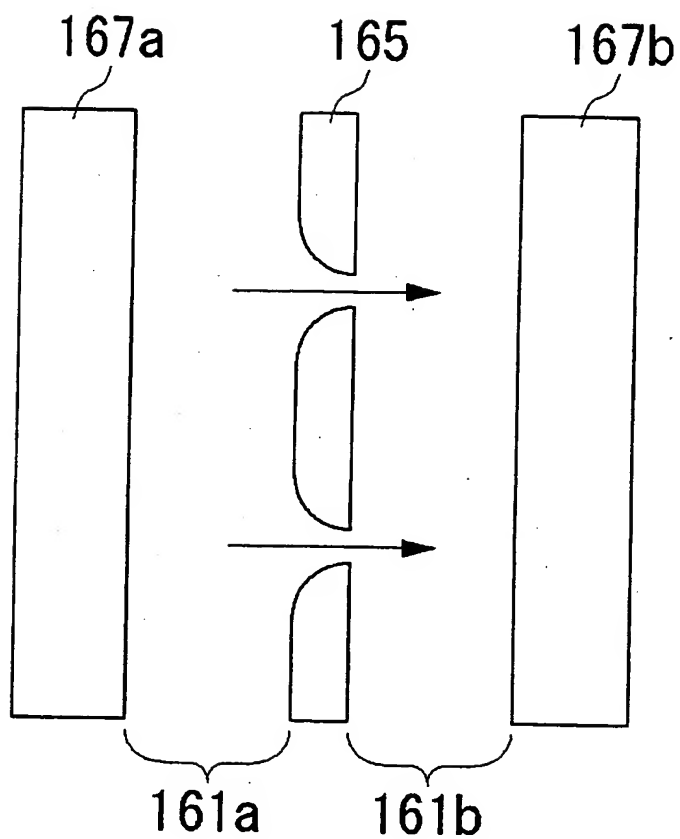


図 6

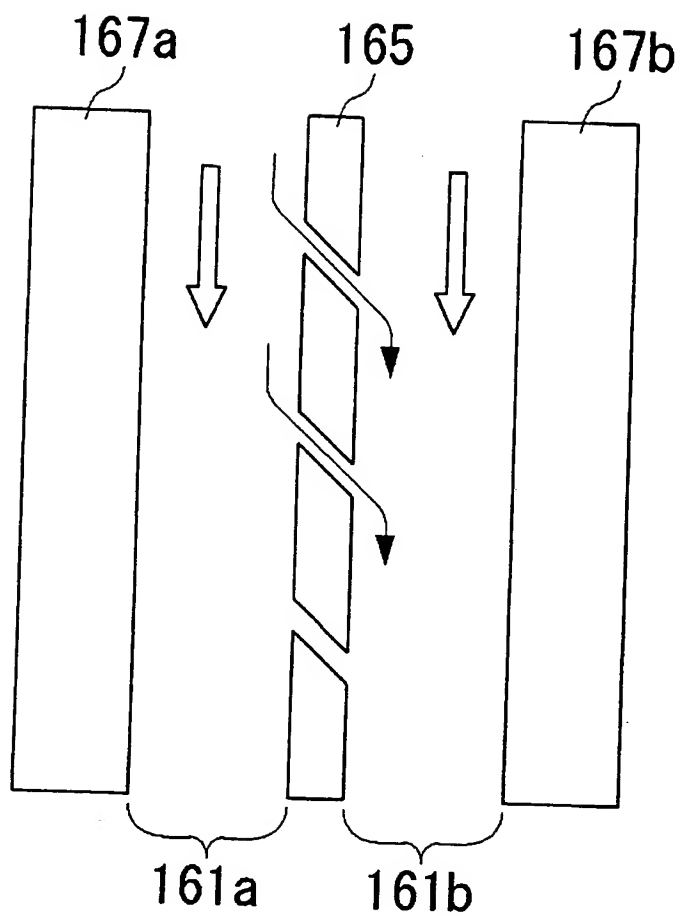


図 7

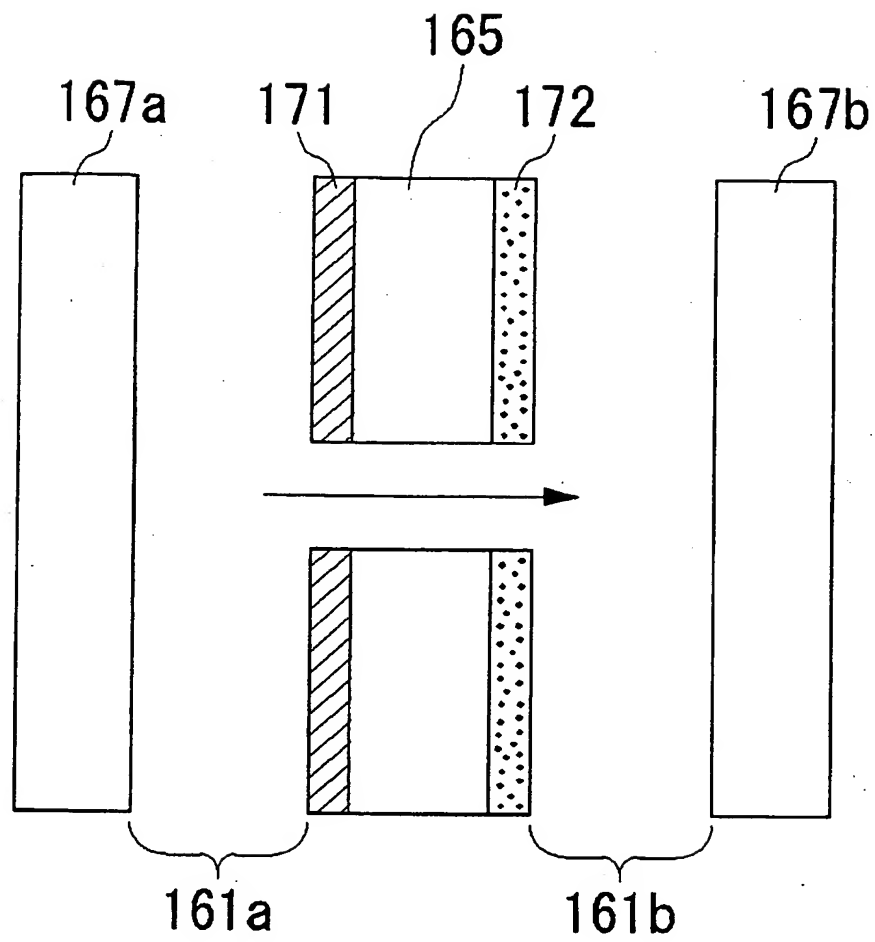


図 8

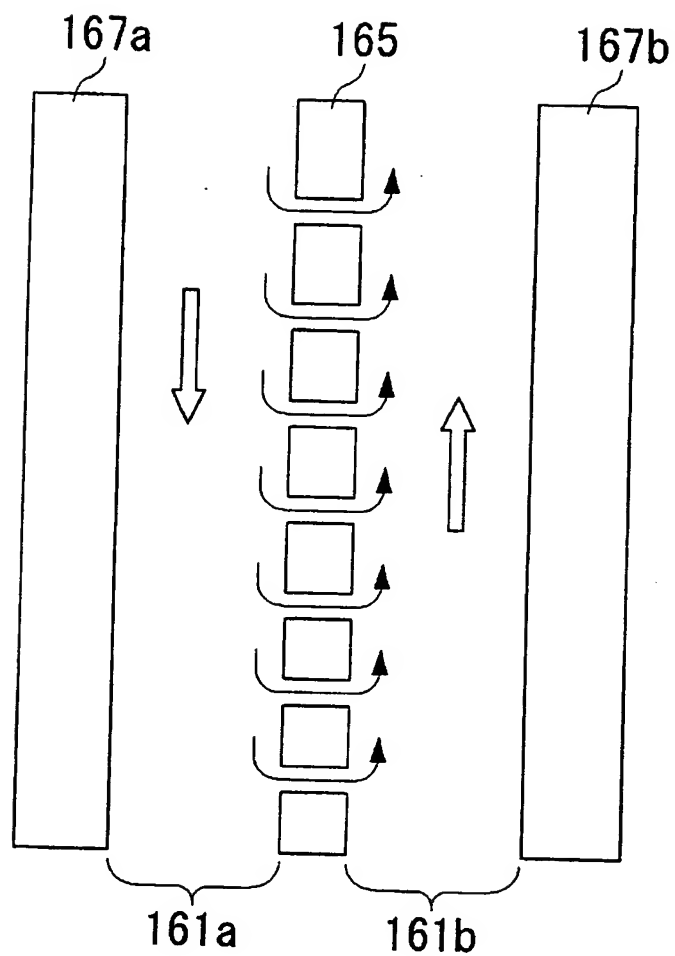


図 9

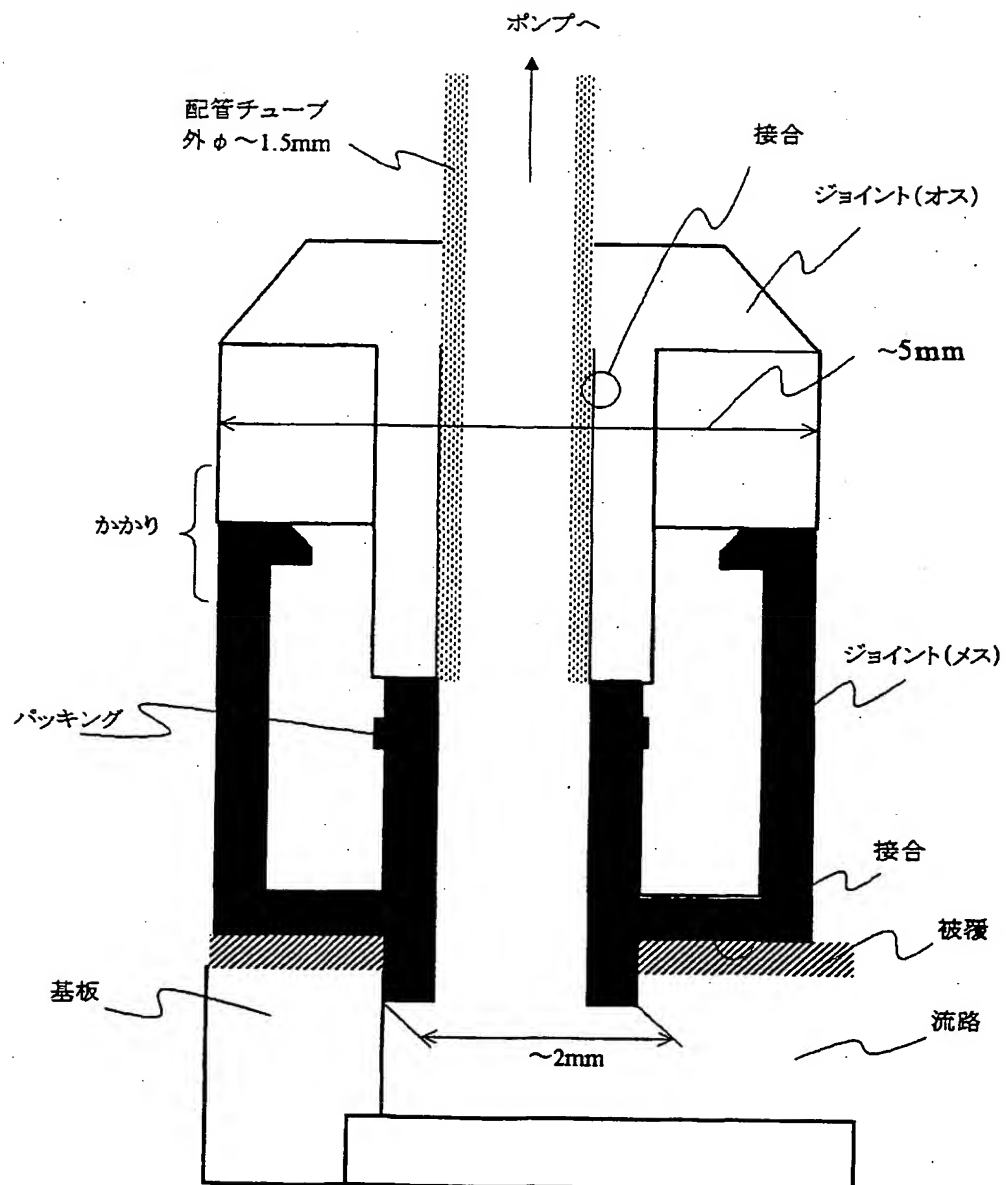
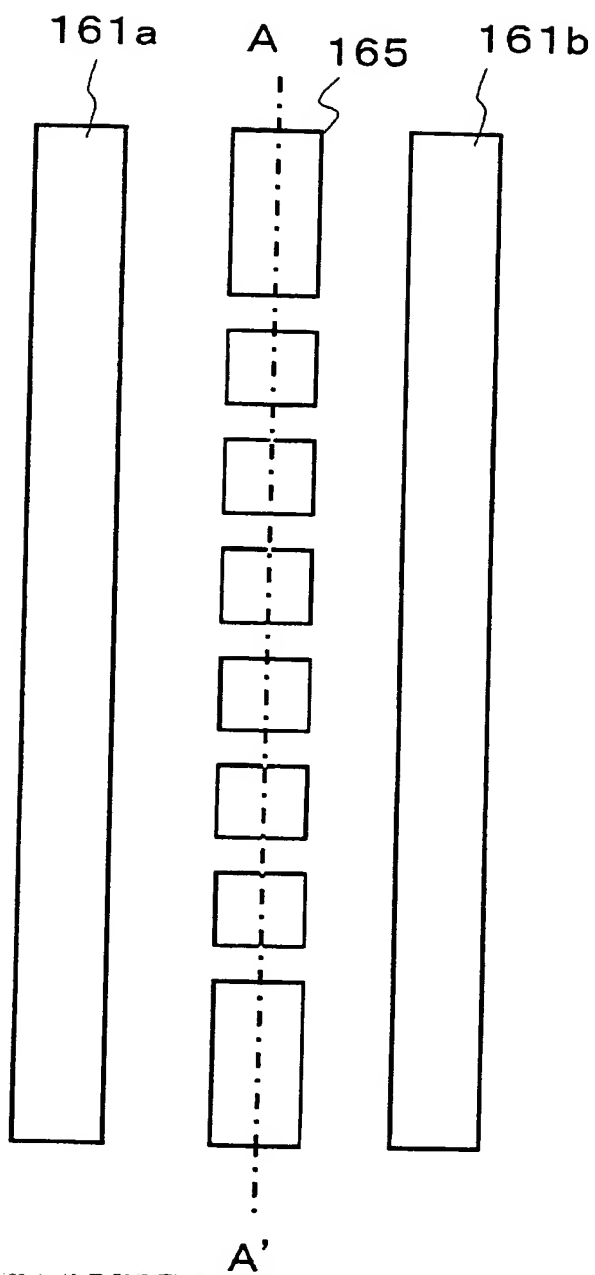


図 10





11

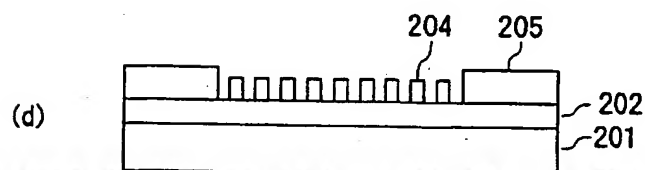
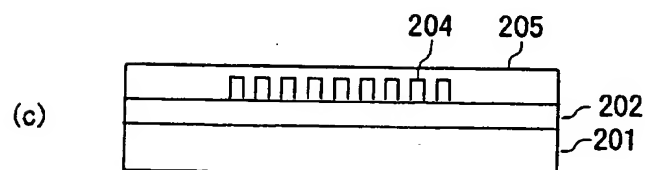
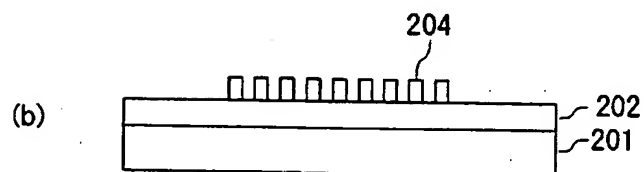
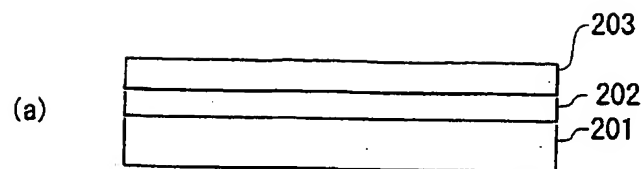


図 12,

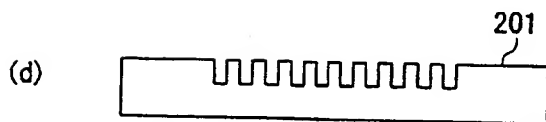
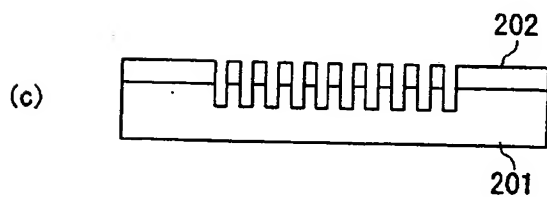
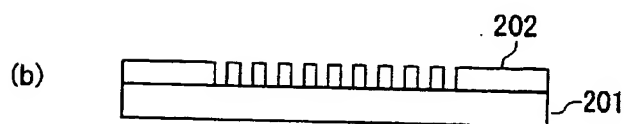


图 13

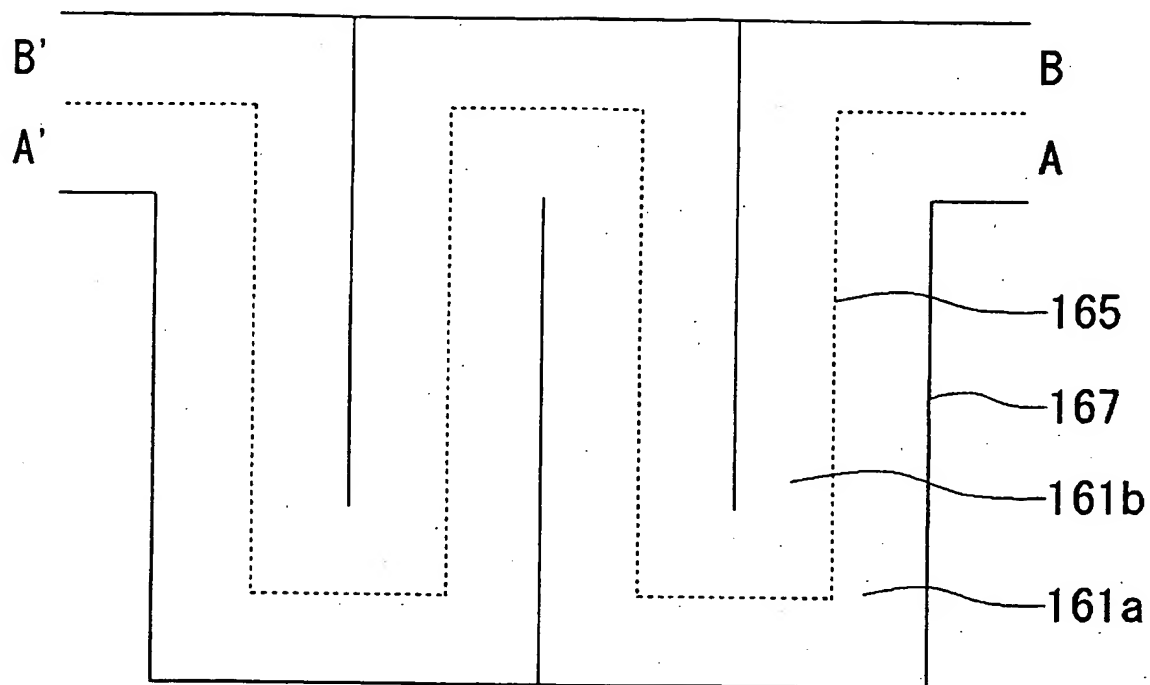


図 14

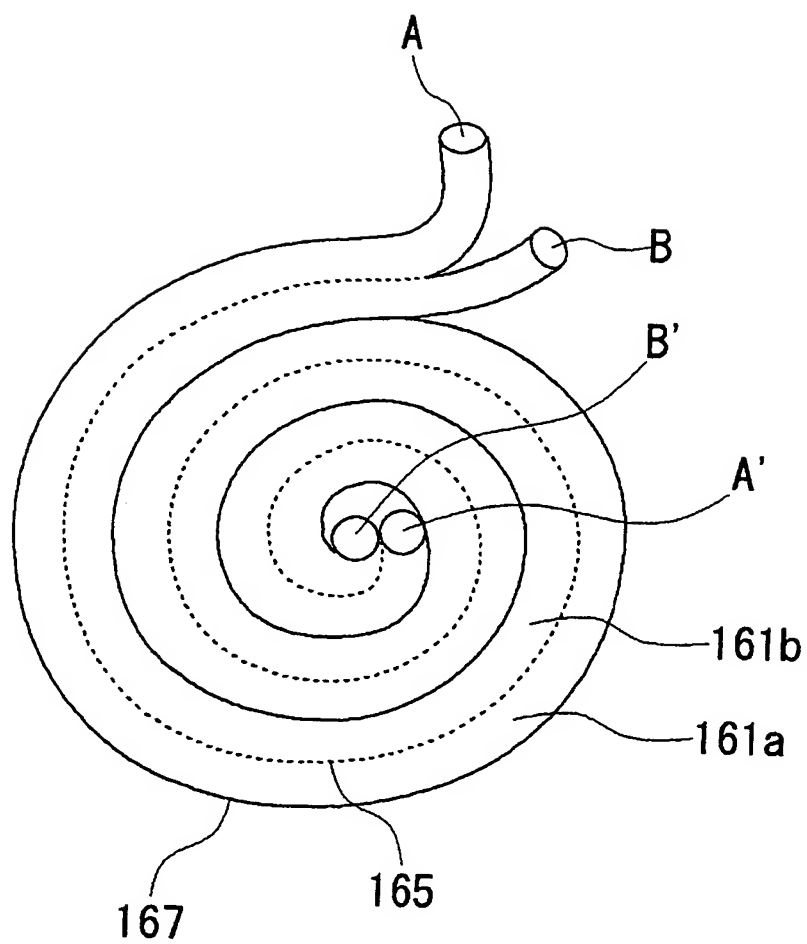


图 15

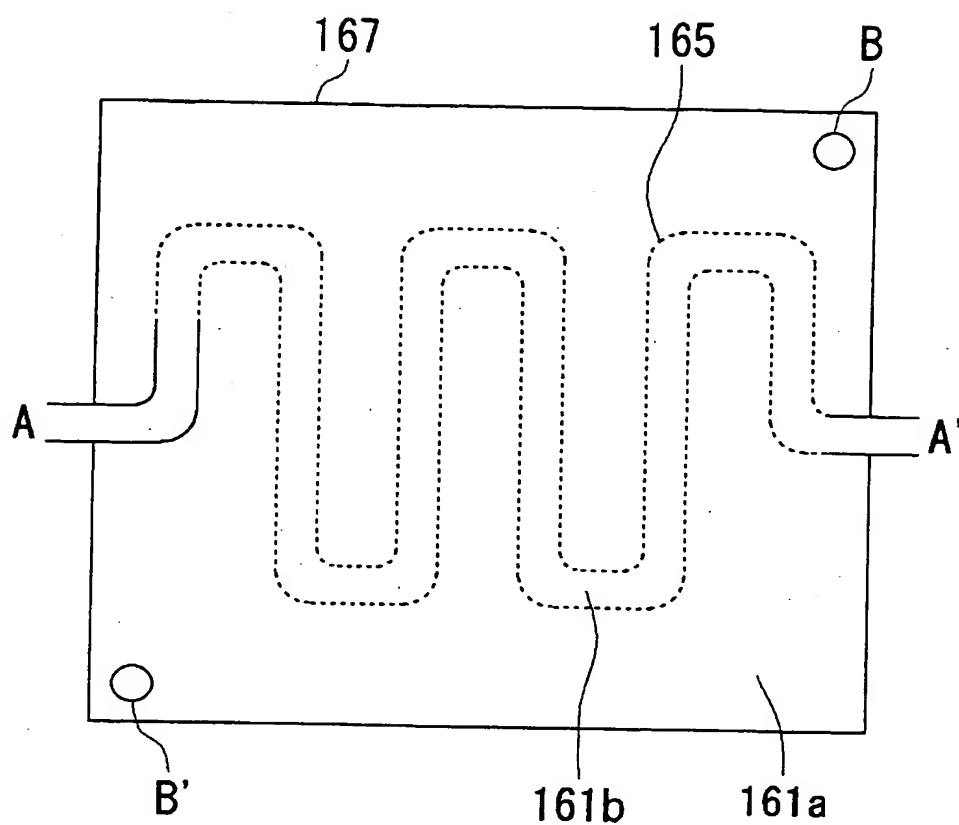


図 16

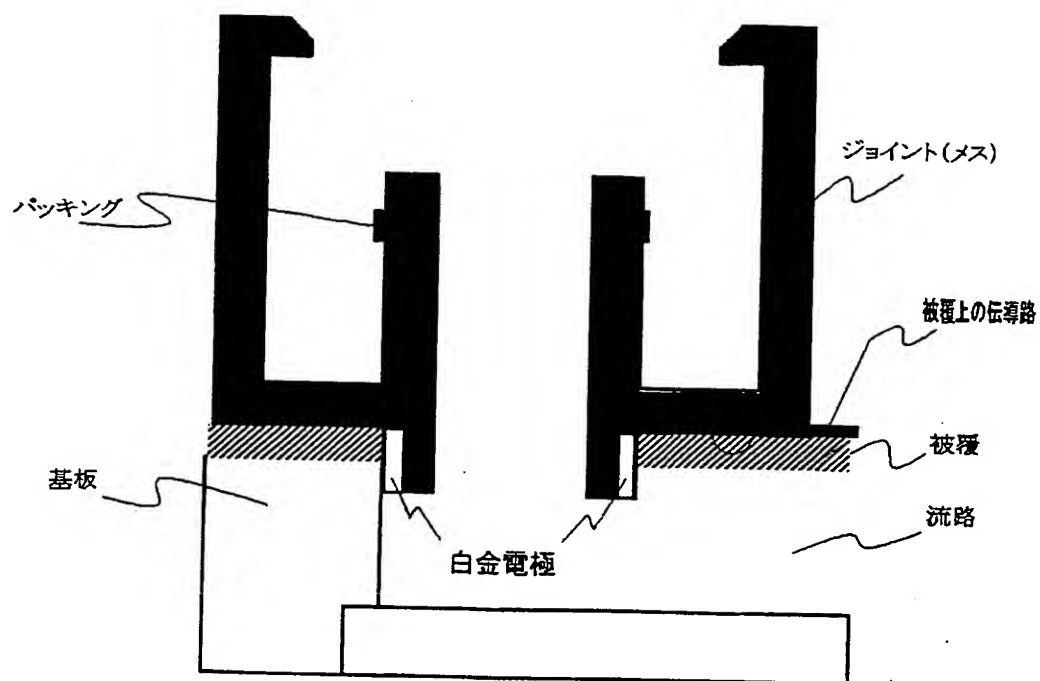
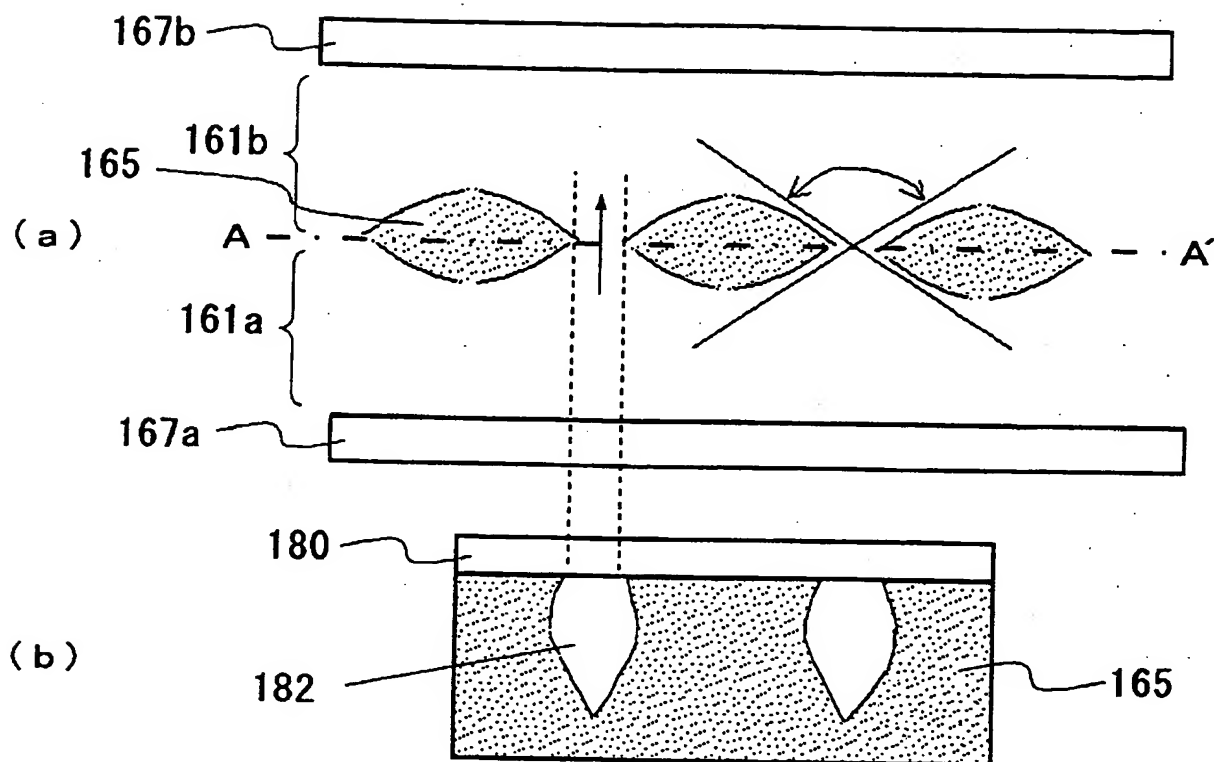
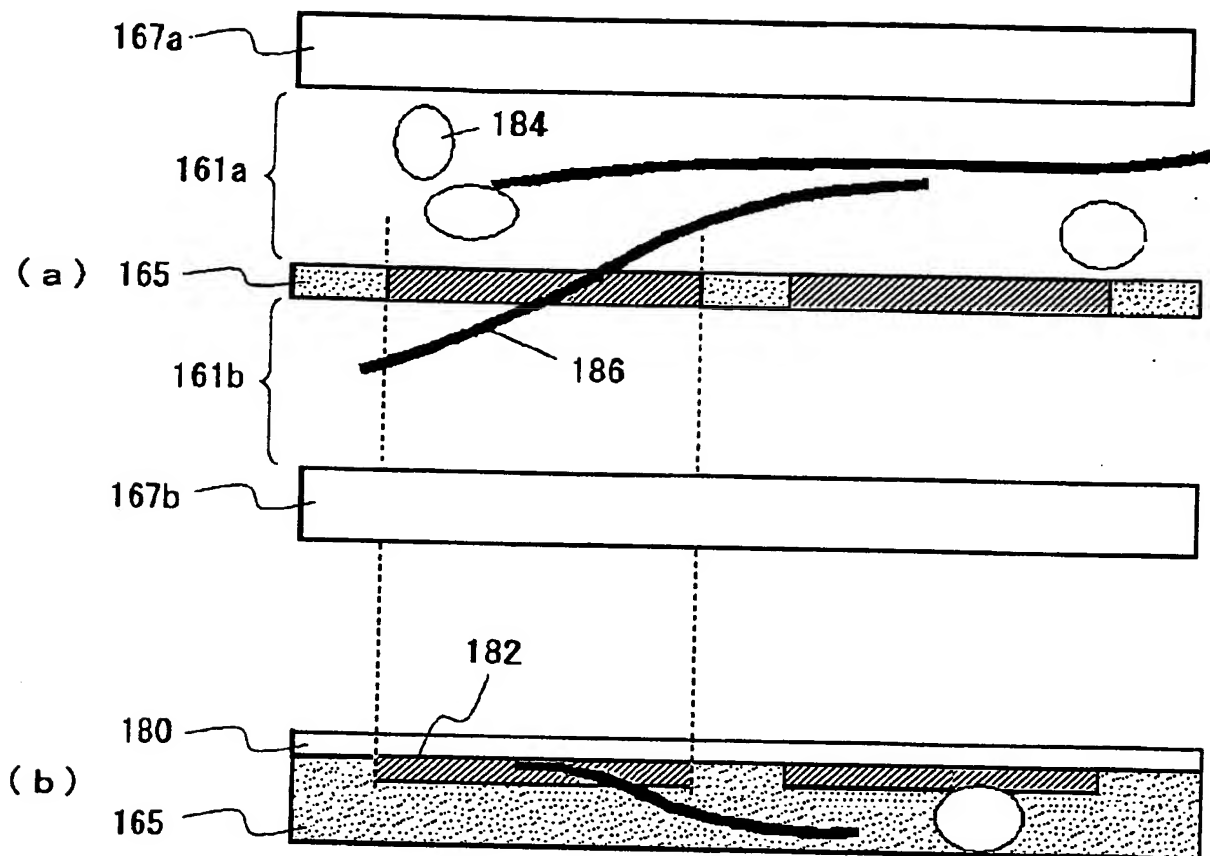


図 17



18





19

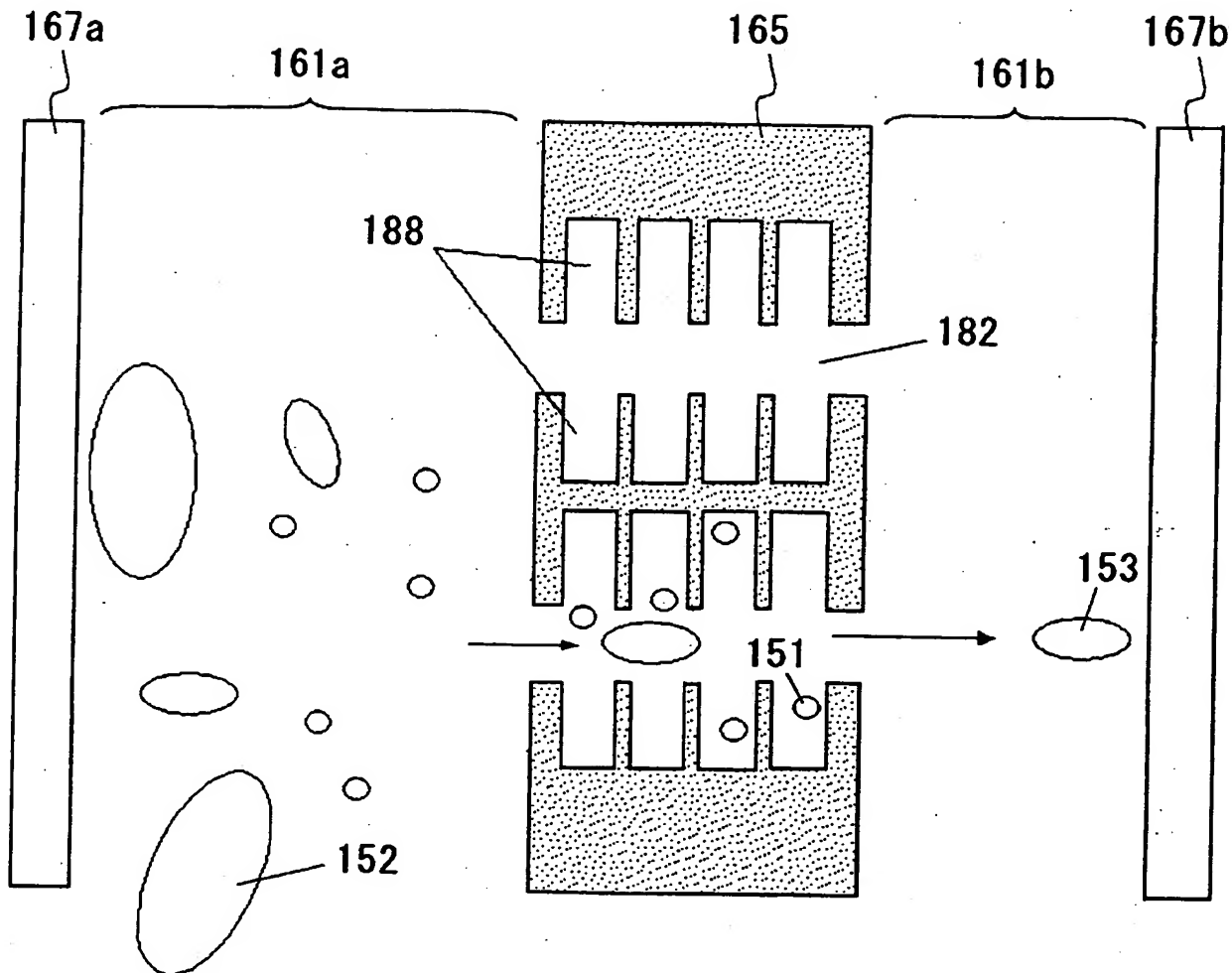


図 20

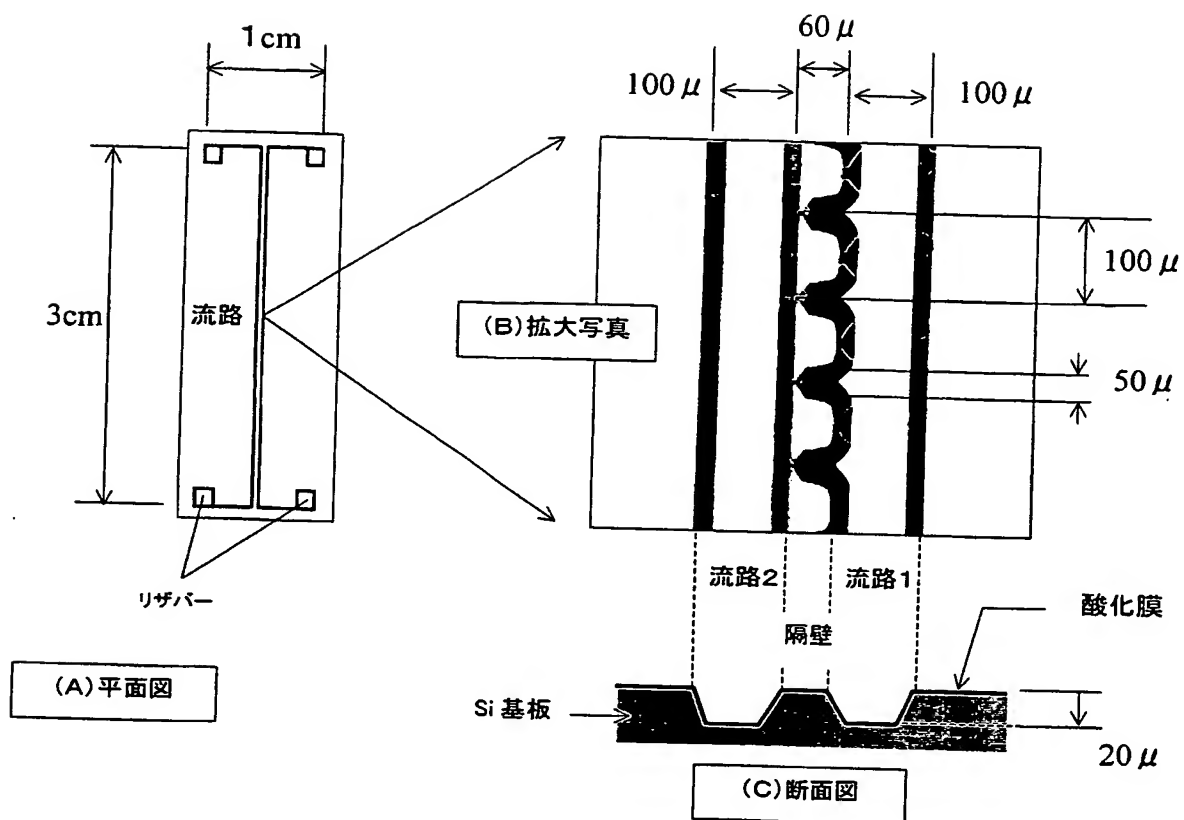


図 2 1

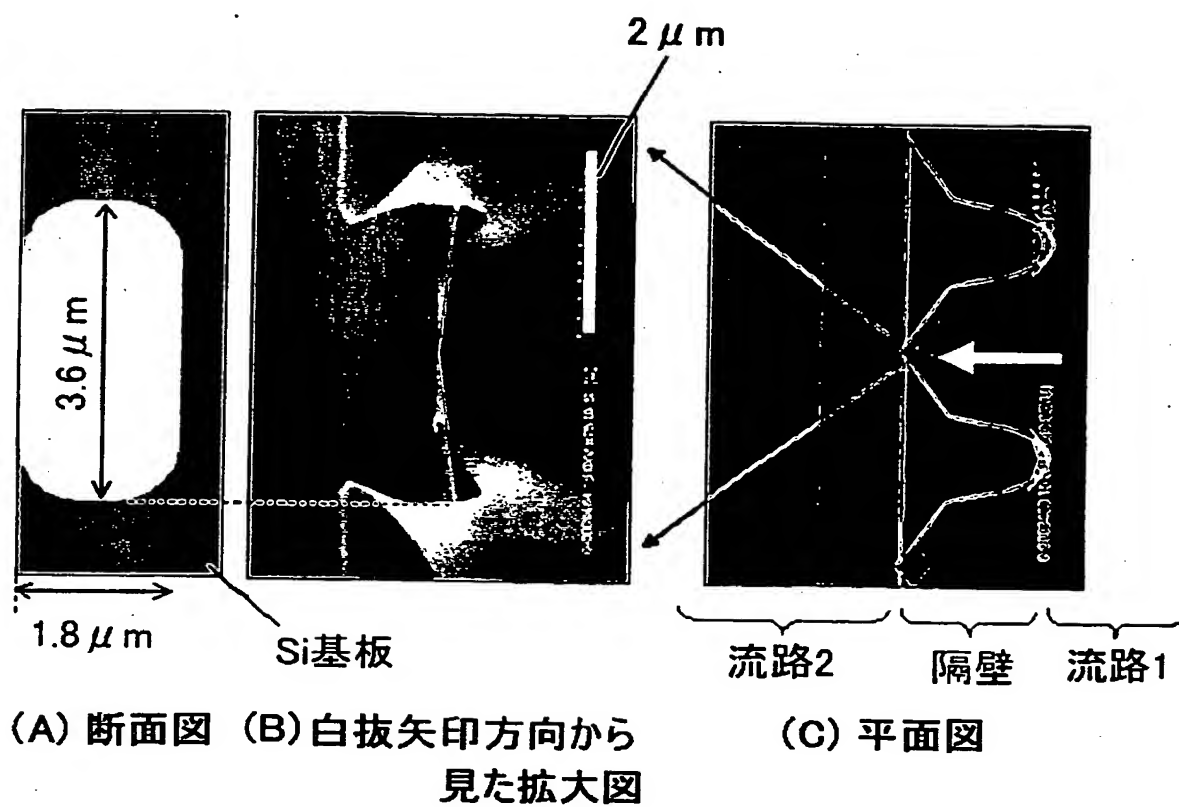
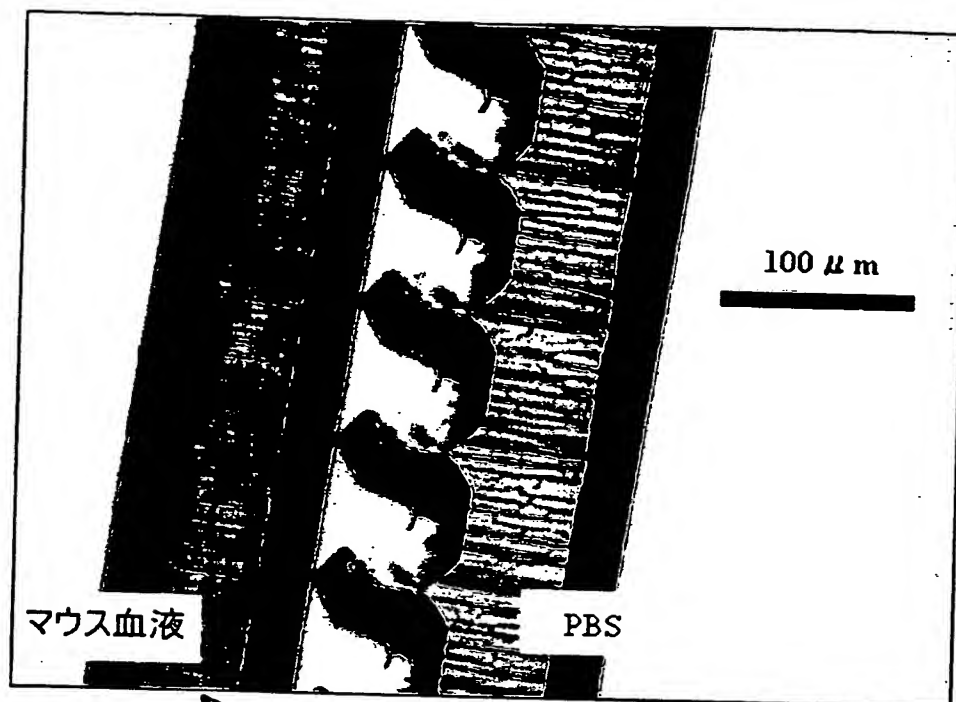


図 2 2

(a)

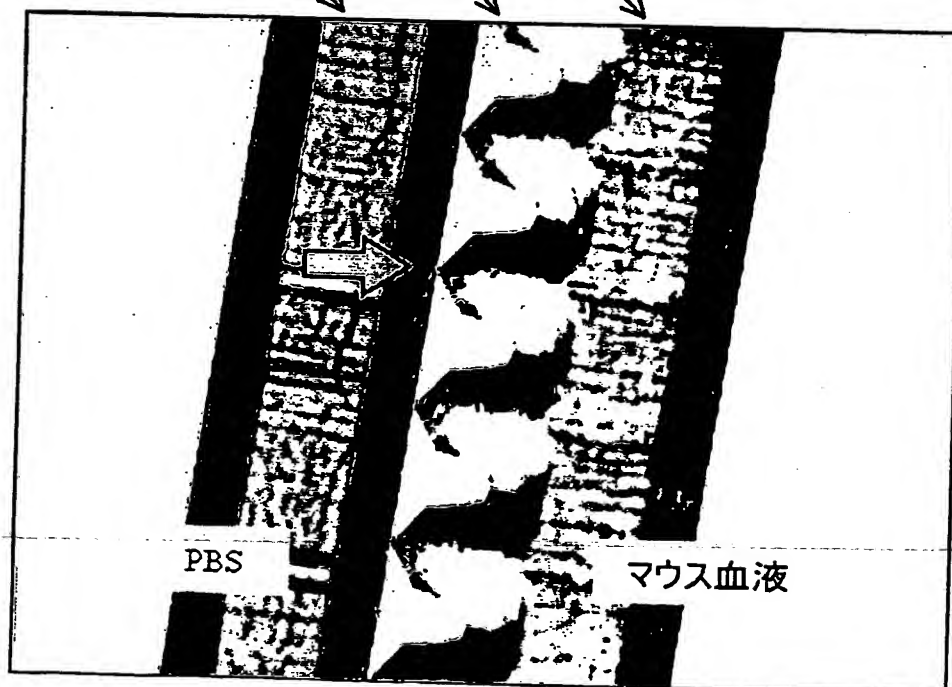


流路2

隔壁

流路1

(b)



PBS

マウス血液

図 2 3

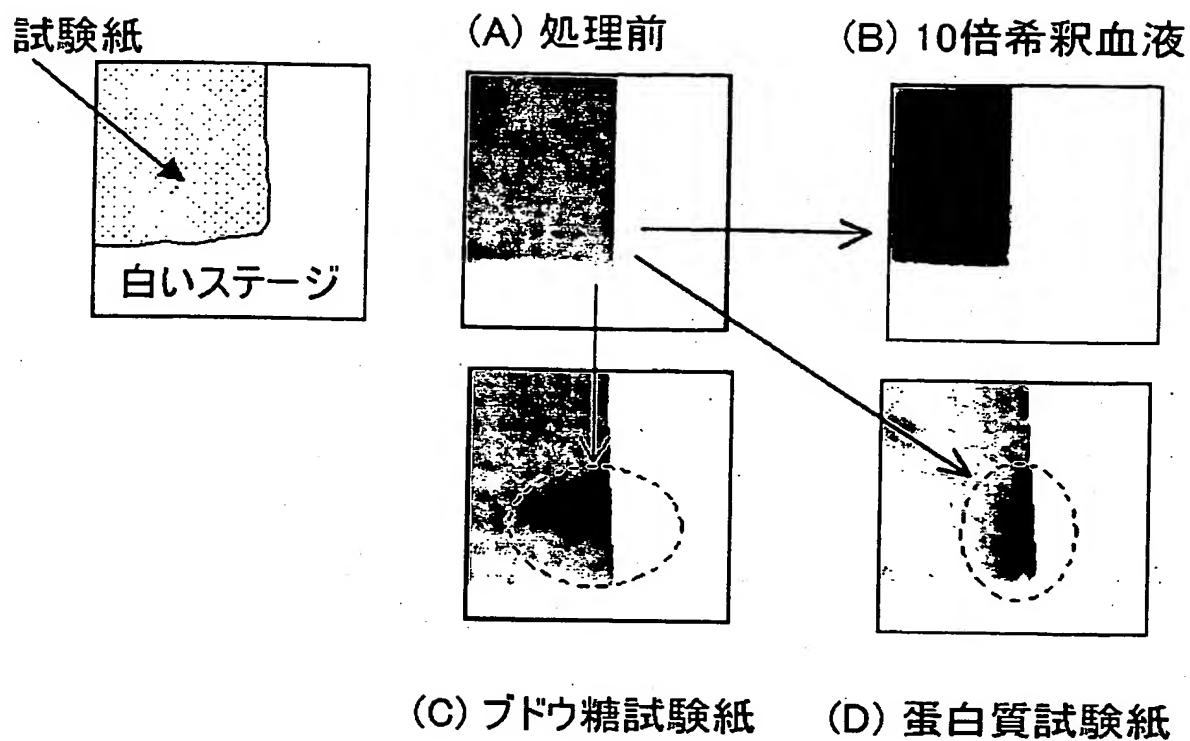


図 24

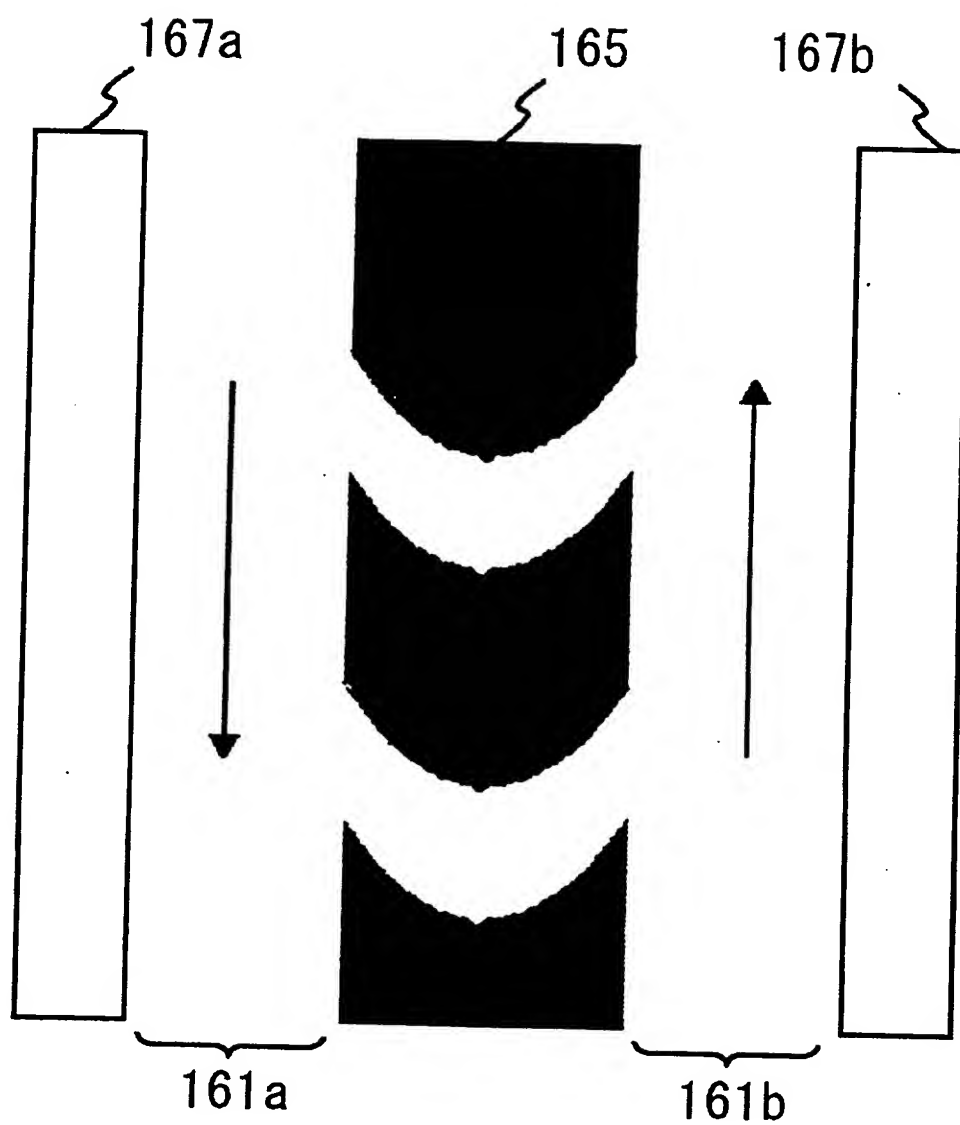
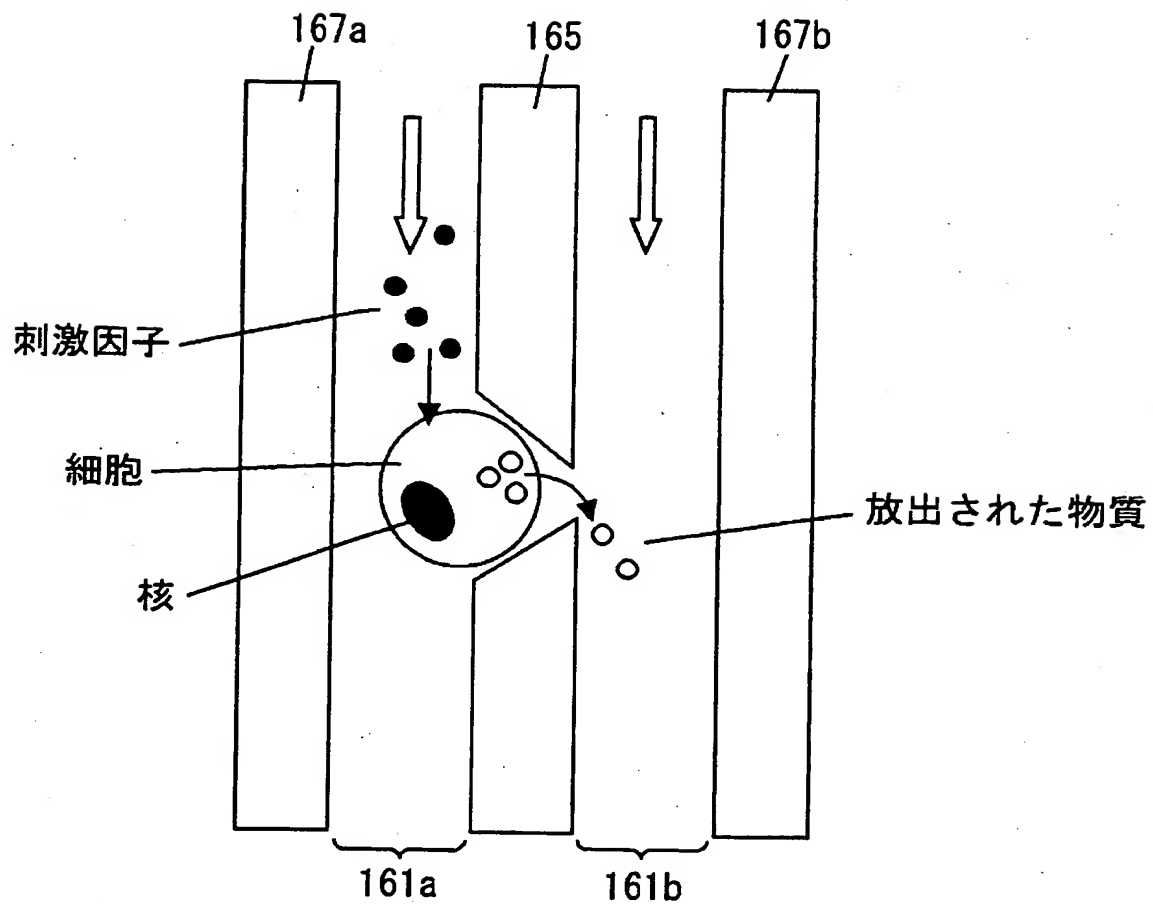
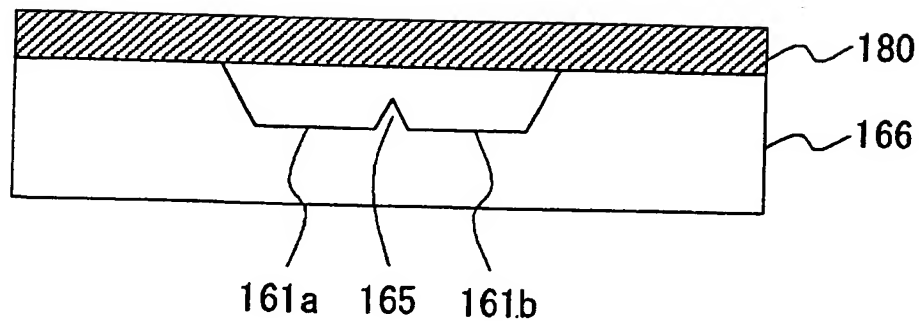


図 25



26

(a)



(b)

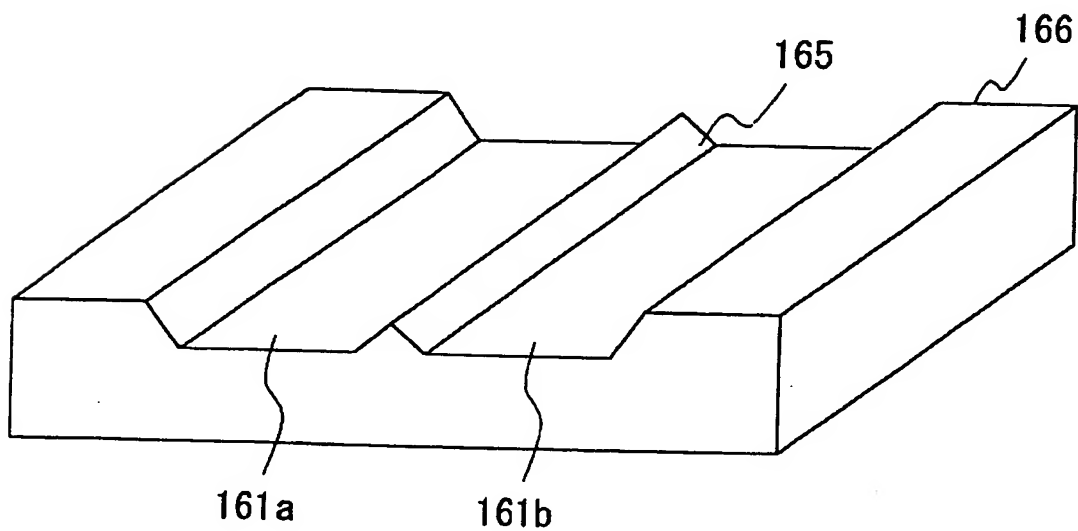




図 27

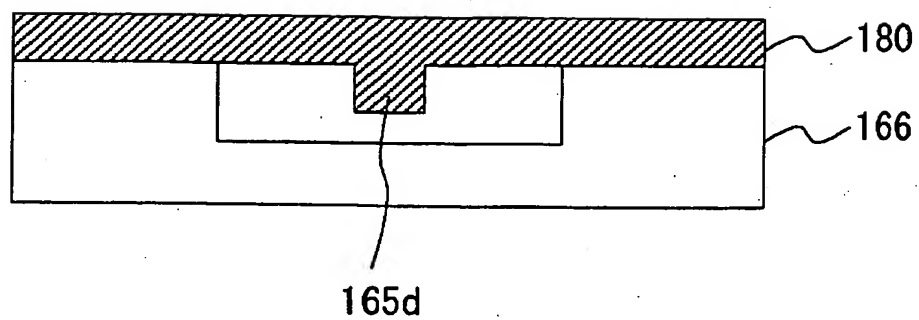


図 28

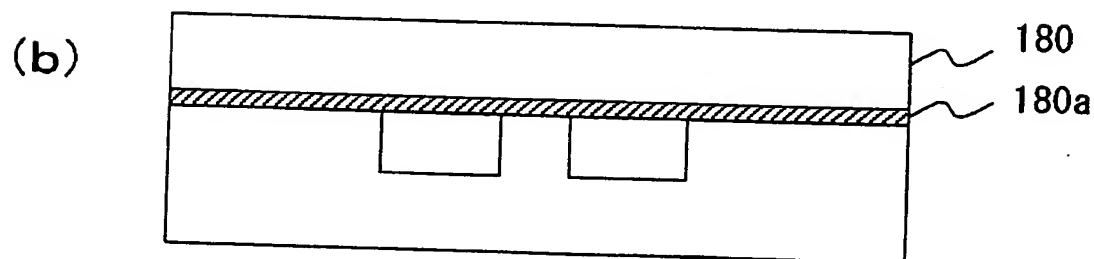
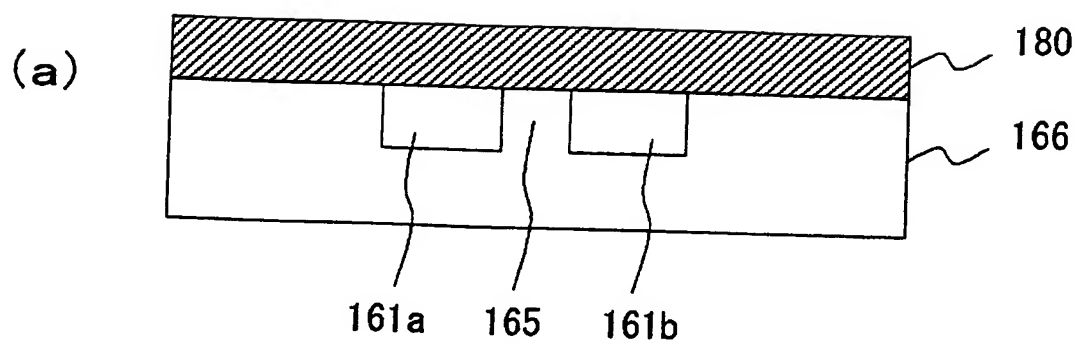
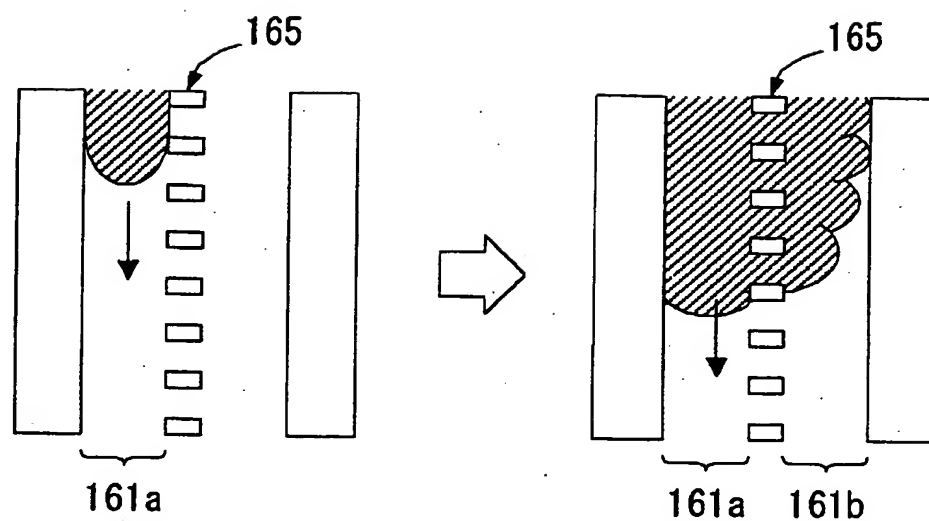


図 29

(a)



(b)

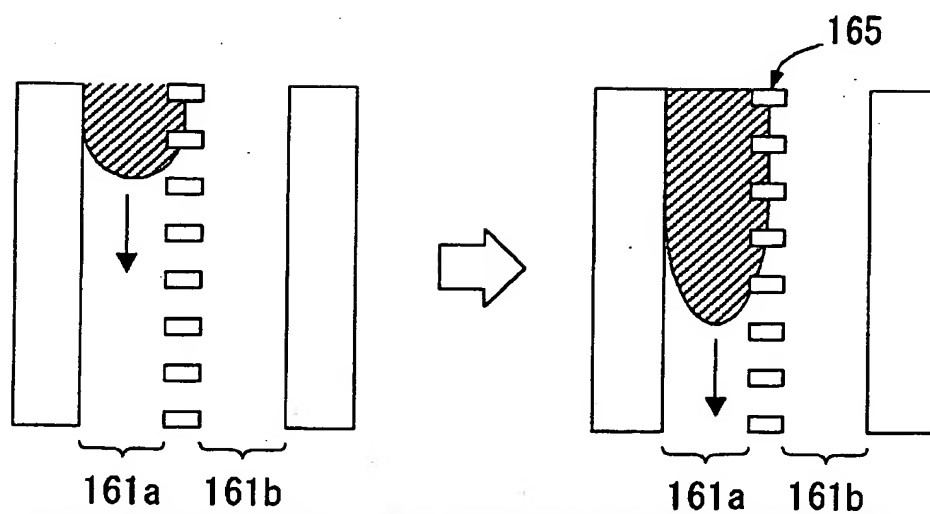


図 30

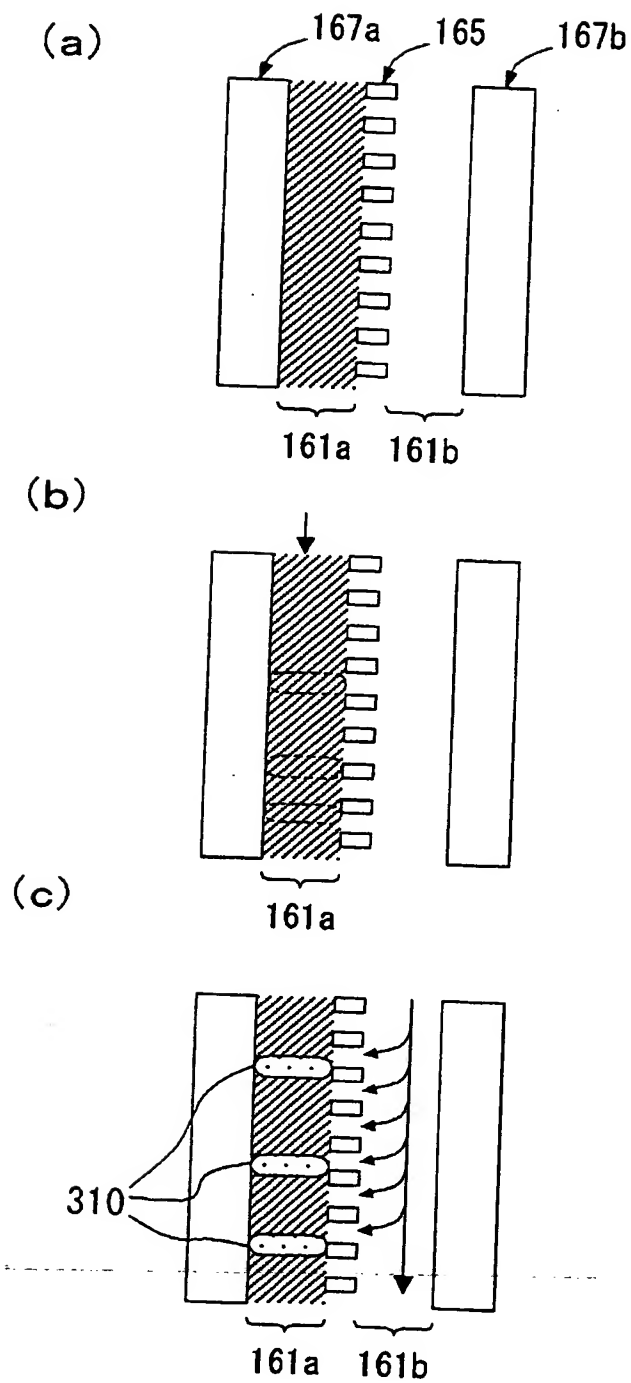


図 3 1

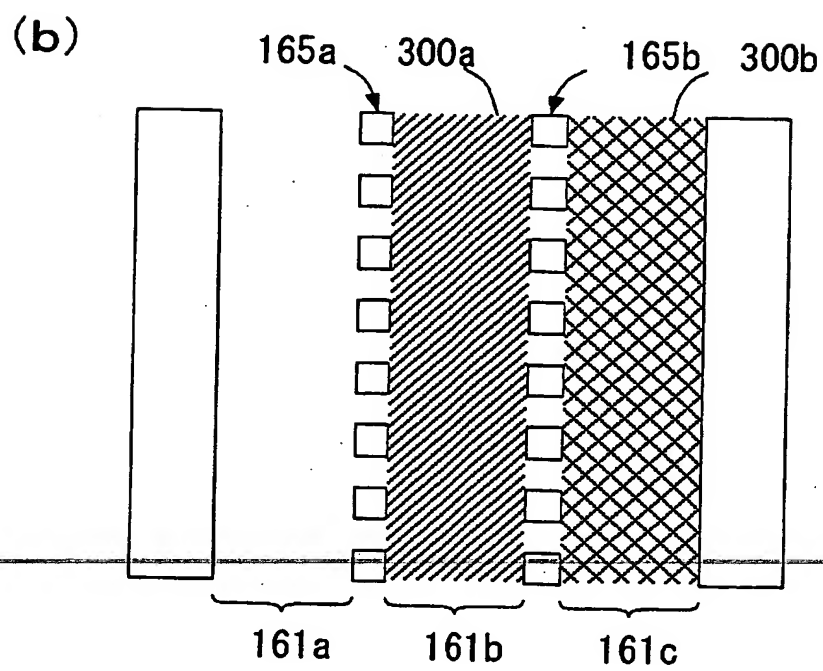
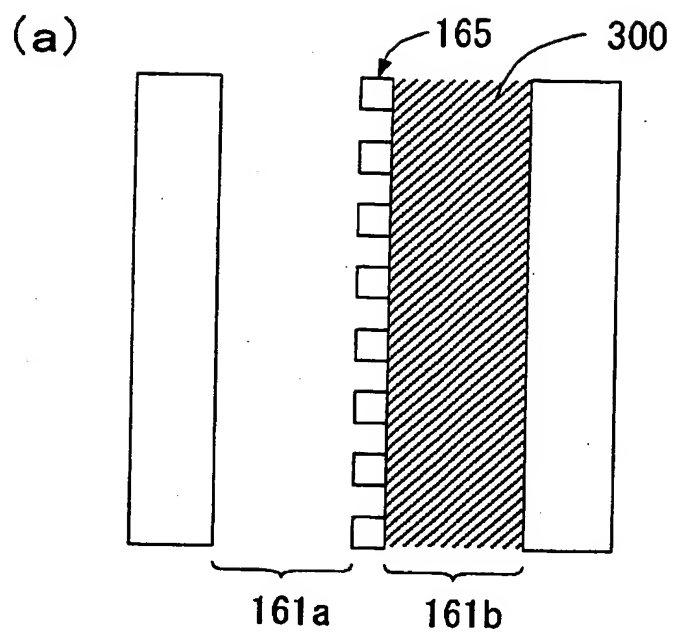


図 3 2

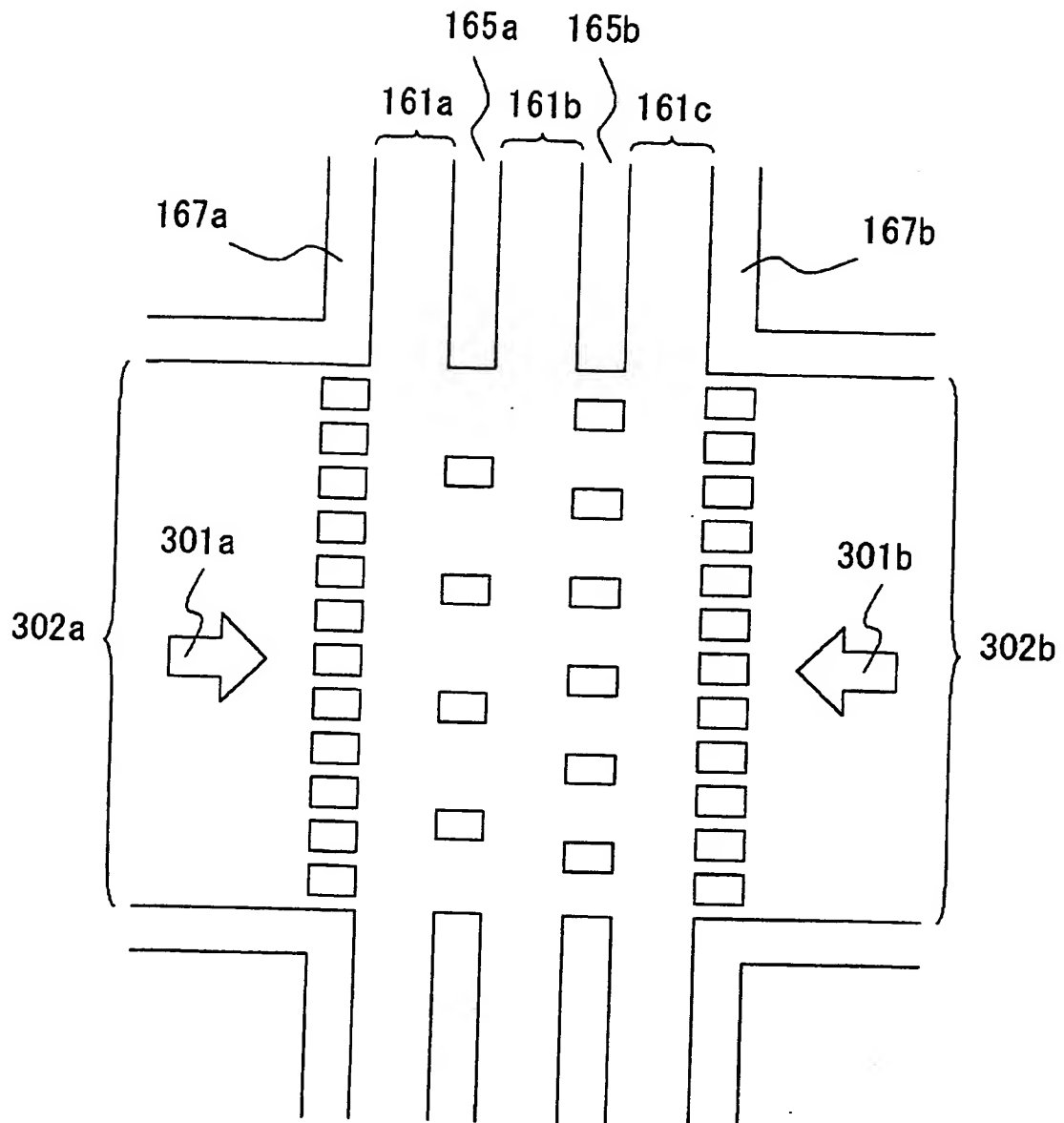


図 3 3

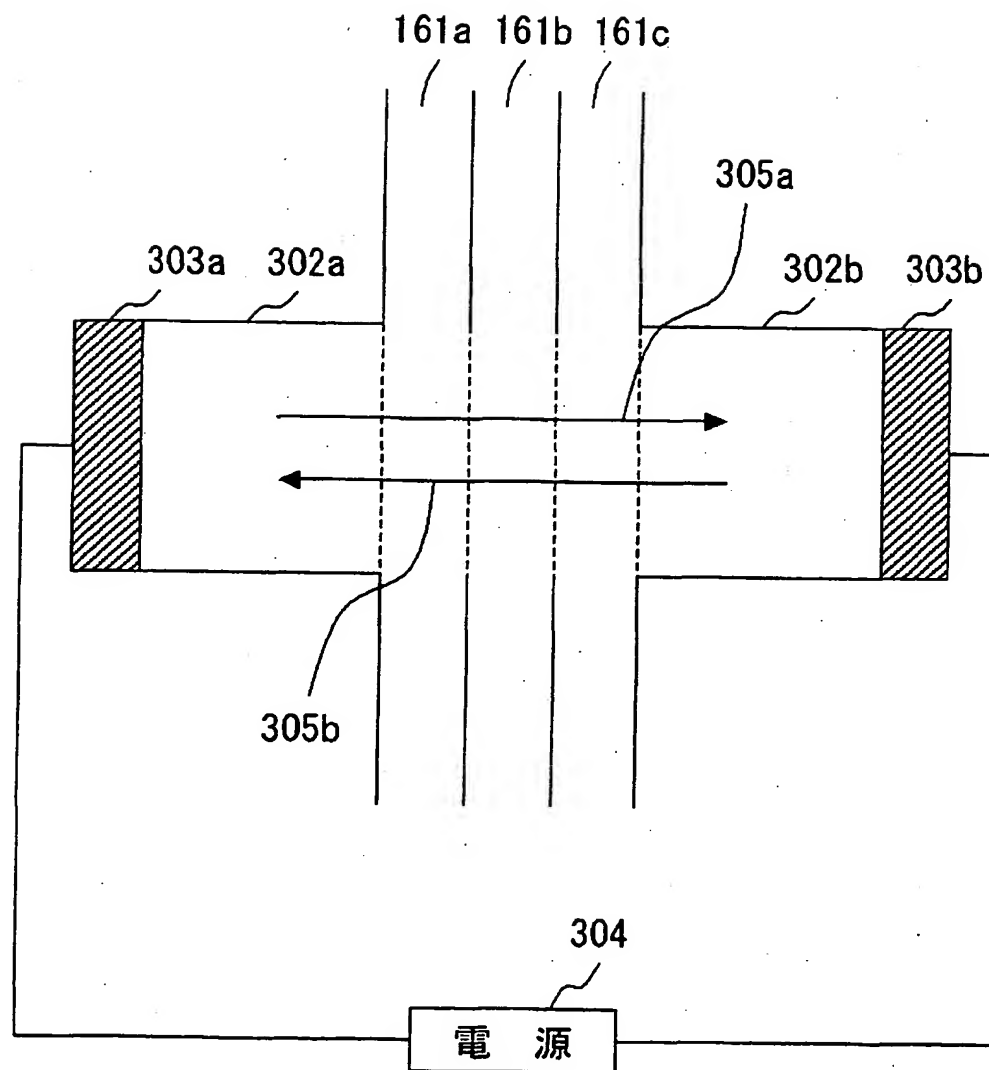


図 34

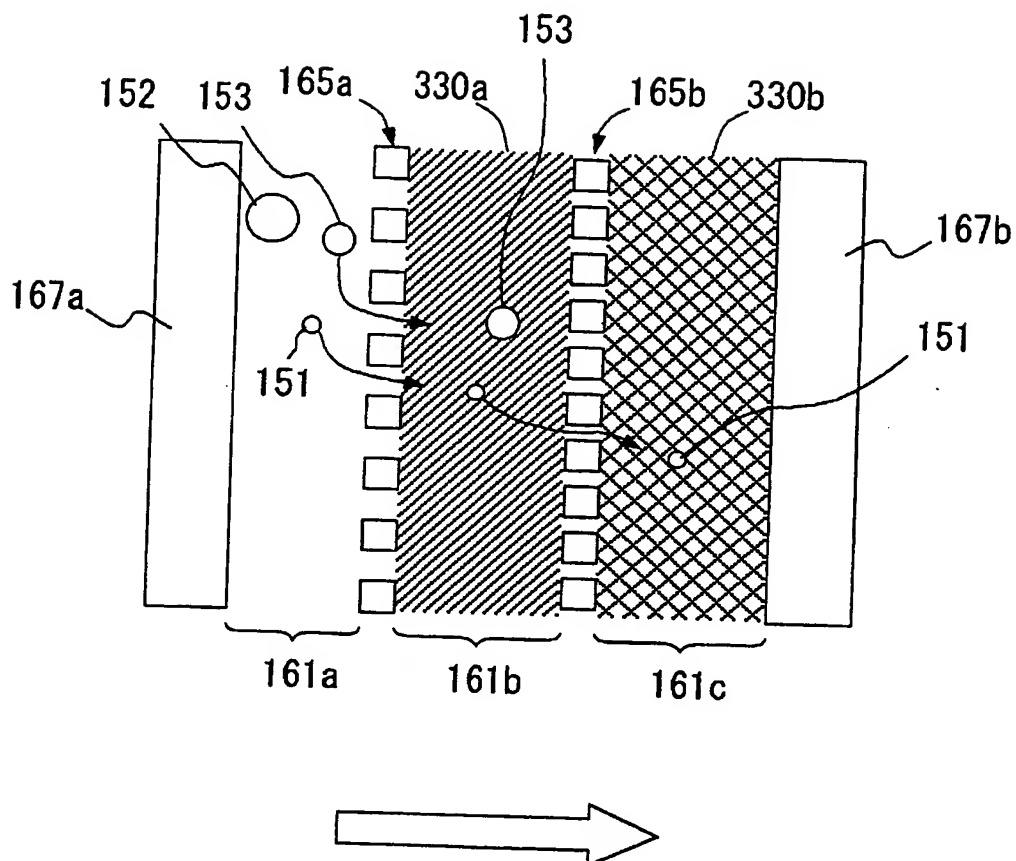




図 35

(a)

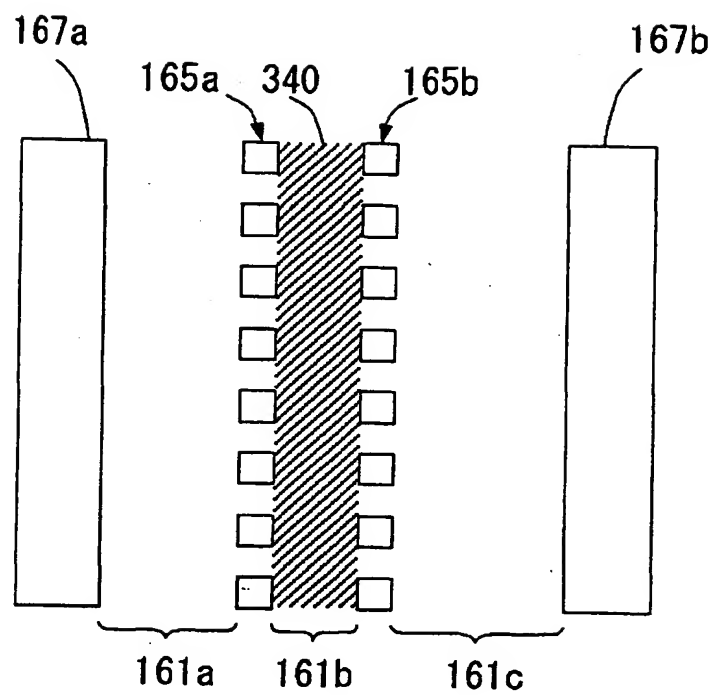


図 3 5

(b)

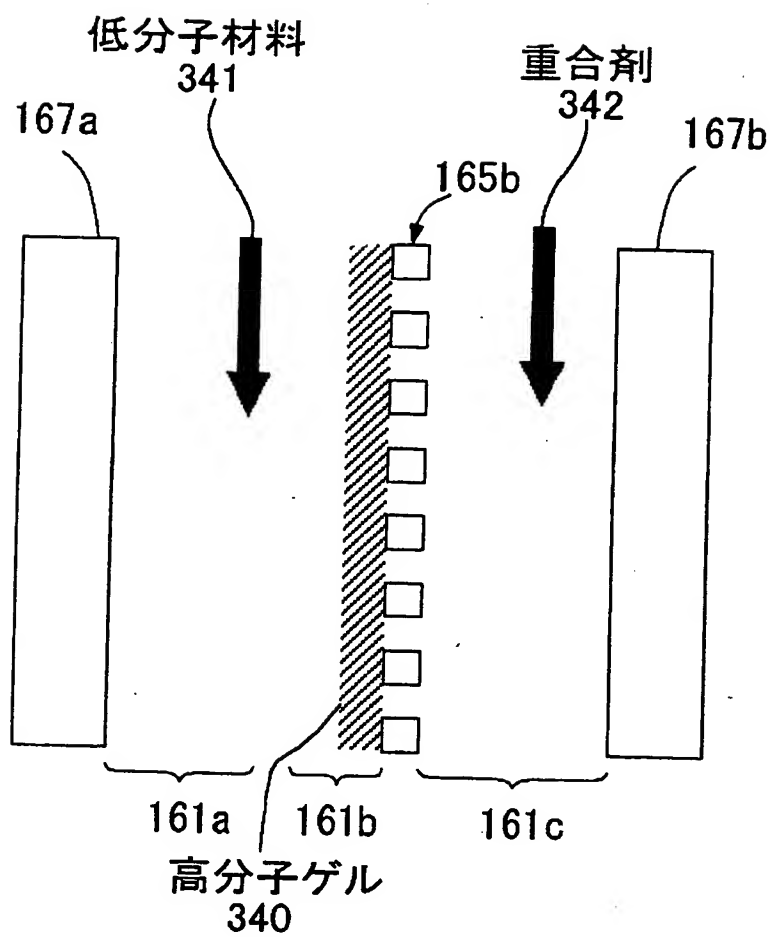


図 36

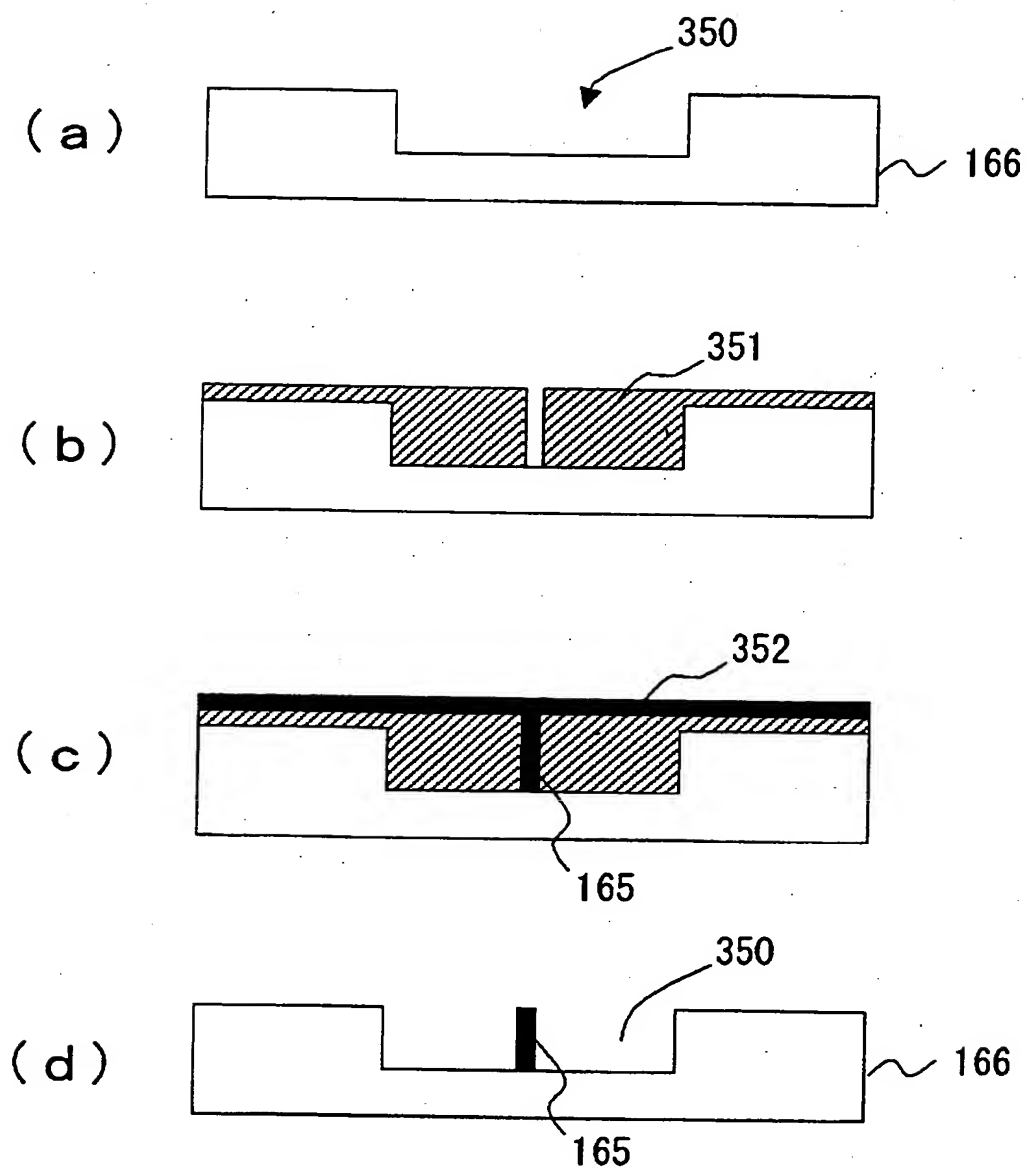


図 37

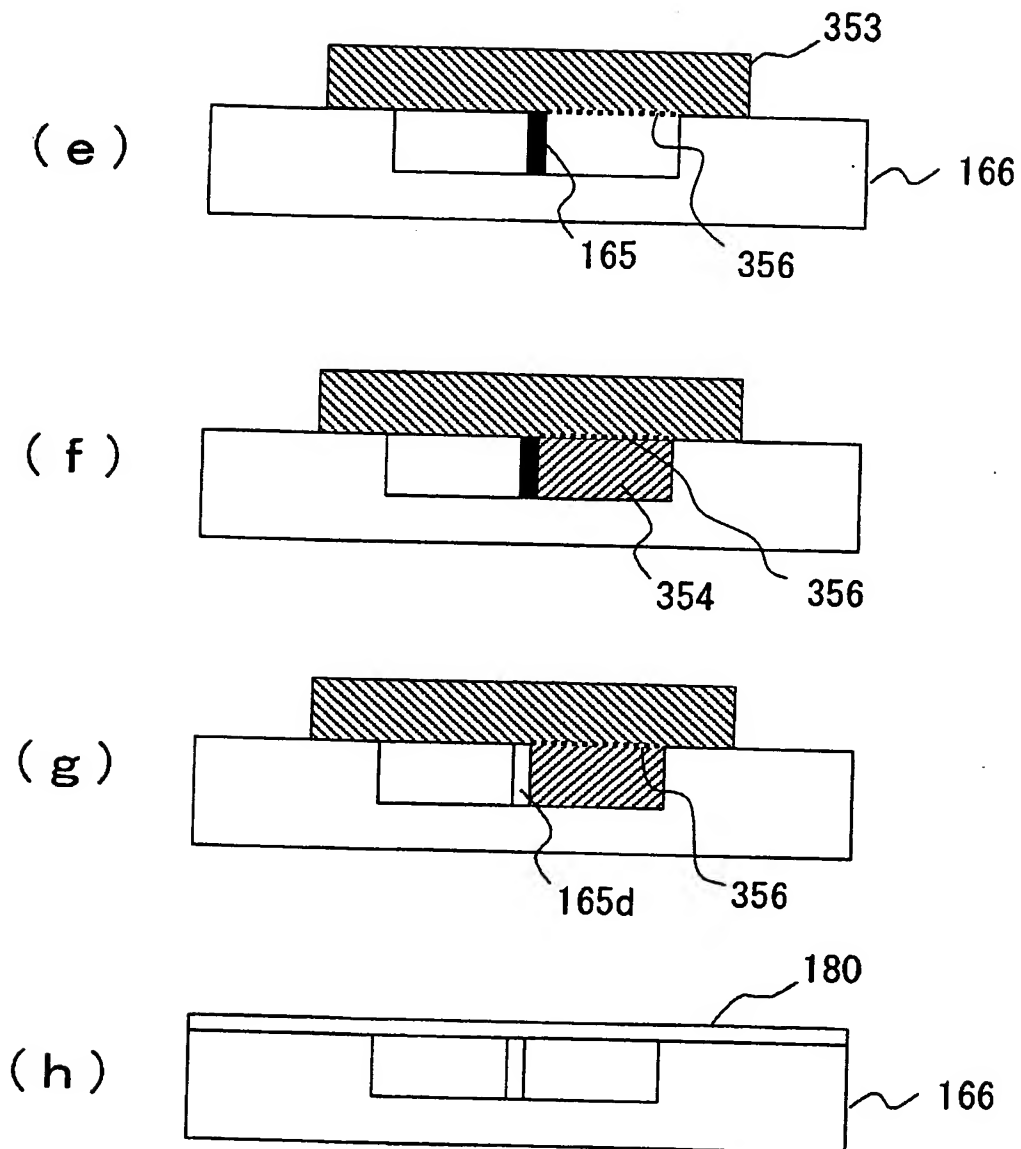


図 38

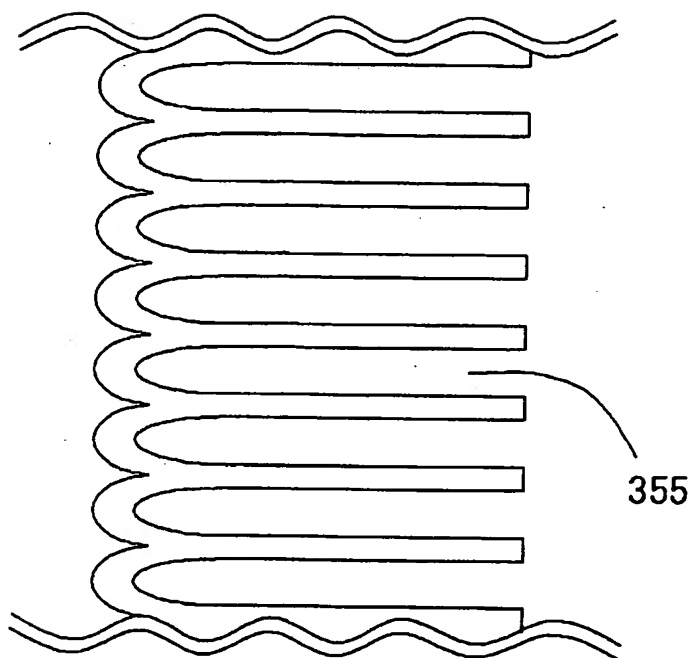
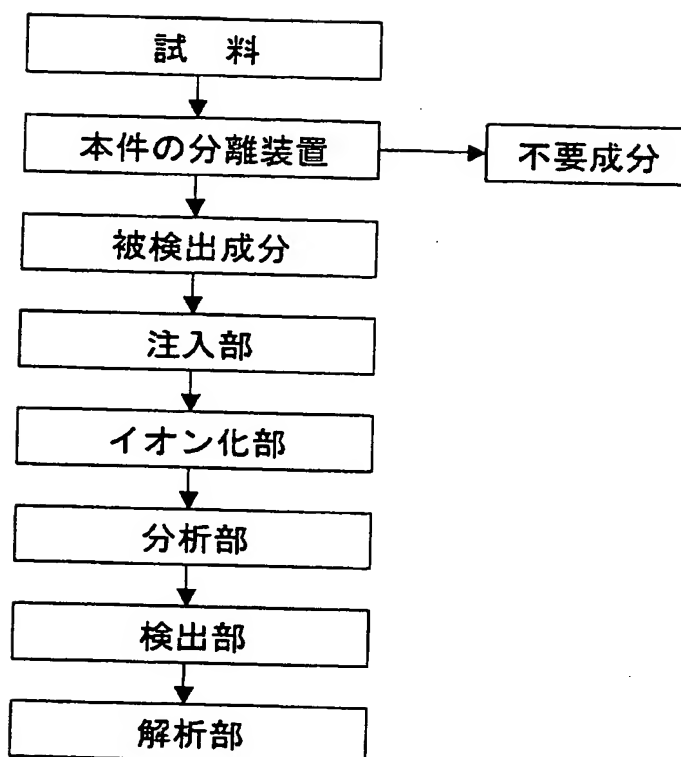
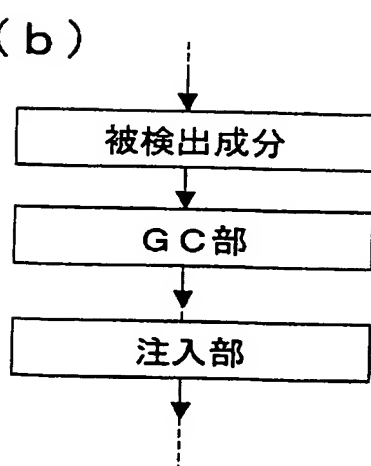


図 3 9

(a)



(b)



(c)

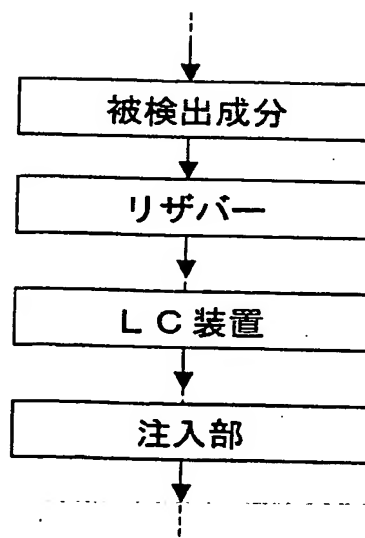
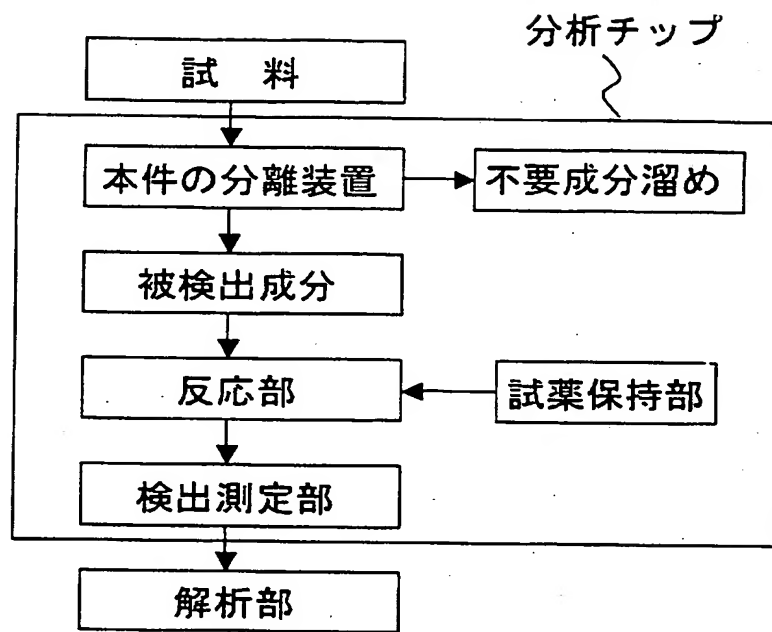
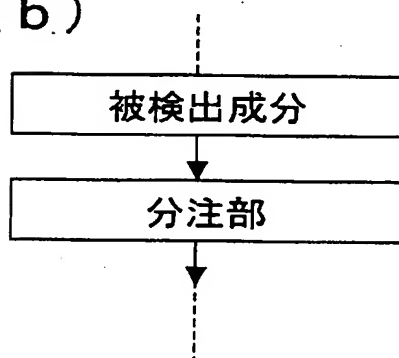


図 4 0

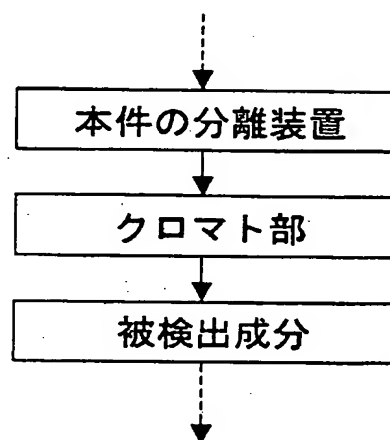
(a)



(b)



(c)



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP02/11144

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> B01D69/00, G01N30/88, G01N1/10, G01N37/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> B01D69/00, G01N35/08, G01N1/10, G01N37/00, B01D11/00-12/00, B01D35/00-35/04, B01J10/00-12/02, B01J14/00-19/06, B01J19/14-19/32

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2003
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2003	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2003

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPIL, JICST

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2000-262871 A (Zaidan Hojin Kawamura Rikagaku Kenkyusho), 26 September, 2000 (26.09.00), Par. Nos. [0001], [0034] to [0047]; Figs. 1 to 5 (Family: none)	1, 3, 5-7, 14, 16, 17, 26, 28-30
A	Same as the above	18, 20, 25, 45-47
X	WO 96/12540 A1 (Central Research Laboratories Ltd.), 02 May, 1996 (02.05.96), Page 5, line 20 to page 8, line 30; Figs. 1 to 5 & JP 10-507406 A & EP 787029 A1 & US 5961832 A	10-12, 14, 16
Y	Same as the above	1-9, 13, 15, 17, 23, 24

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
23 January, 2003 (23.01.03)

Date of mailing of the international search report  
12 February, 2003 (12.02.03)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/11144

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 10-318982 A (Olympus Optical Co., Ltd.), 04 December, 1998 (04.12.98), Par. Nos. [0044] to [0055]; Figs. 1 to 7 (Family: none)	1-8, 21, 22, 27
Y	Same as the above	19
X	WO 99/50436 A1 (Roche Diagnostics GmbH), 07 October, 1999 (07.10.99), Claims; page 11, line 22 to page 14, lines 22; Figs. 1a to 1e & EP 1068348 A1 & JP 2002-509730 A	28-31, 43
Y	Same as the above	1-8, 17
X	JP 53-029994 A (Kuraray Co., Ltd.), 20 March, 1978 (20.03.78), Page 2, upper left column, line 15 to page 3, upper left column, line 1 (Family: none)	31, 33-36, 38-40
Y	Same as the above	9
X	JP 63-032478 A (National Food Research Institute, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries), 12 February, 1988 (12.02.88), Claims; page 3, upper right column, line 14 to page 4, lower right column, line 4 (Family: none)	32-40
X	JP 10-296060 A (Organo Corp.), 10 November, 1998 (10.11.98), Par. Nos. [0015] to [0018] (Family: none)	41, 42
X	JP 05-023547 A (Nissin Electric Co., Ltd.), 02 February, 1993 (02.02.93), Par. No. [0007] (Family: none)	44
Y	JP 2000-298109 A (The Kanagawa Academy of Science), 24 October, 2000 (24.10.00), Par. Nos. [0002] to [0024] (Family: none)	1-9, 13, 15, 23, 24
Y	EP-0701857-A1 (Bend Research, Inc.), 20 March, 1996 (20.03.96), Page 4, lines 37 to 47; Fig. 1 & JP 08-168655 A & US 5681433 A	15
Y	JP 06-254362 A (Rengo Co., Ltd., Hitachi Zosen Corp.), 13 September, 1994 (13.09.94), Claims; Par. No. [0021] (Family: none)	15

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1998)

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/11144

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 10-085568 A (Tonen Corp.), 07 April, 1998 (07.04.98), Claims (Family: none)	13, 23, 24
Y	JP 2000-105219 A (Sanyo Electric Co., Ltd.), 11 April, 2000 (11.04.00), Par. No. [0002] (Family: none)	19

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1998)

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> B01D69/00, G01N30/88, G01N1/10, G01N37/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> B01D69/00, G01N35/08, G01N1/10, G01N37/00, B01D11/00  
-12/00, B01D35/00-35/04, B01J10/00-12/02, B01J14/00  
-19/06, B01J19/14-19/32

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1926-1996
日本国公開実用新案公報	1971-2003
日本国登録実用新案公報	1994-2003
日本国実用新案登録公報	1996-2003

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPIL, JICST

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 2000-262871 A (財団法人川村理化学研究所) 2000. 09. 26 [0001], [0034]-[0047], 図1-5 (ファミリーなし)	1, 3, 5- 7, 14, 16, 17, 26, 28- 30
A	同上	18, 20, 25, 45- 47

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に関する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

23. 01. 03

国際調査報告の発送日

12.02.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)  
郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

中村 敬子



4D

3030

電話番号 03-3581-1101 内線 3419

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 96/12540 A1 (CENTRAL RESEARCH LABORATORIES LIMITED) 1996. 05. 02 第5頁第20行-第8頁第30行, Fig. 1-5 & JP 10-507406 A & EP 787029 A1 & US 5961832 A	10-12, 14, 16
Y	同上	1-9, 13, 15, 17, 23, 24,
X	JP 10-318982 A (オリンパス光学工業株式会社) 1998. 12. 04 [0044]-[0055], 図1-7 (ファミリーなし)	1-8, 21, 22, 27
Y	同上	19
X	WO 99/50436 A1 (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH) 1999. 10. 07 特許請求の範囲、第11頁22行-第14 頁22行, Fig. 1a-1e & EP 1068348 A1 & JP 2002-509730 A	28-31, 43
Y	同上	1-8, 17
X	JP 53-029994 A (株式会社クラレ) 1978. 03. 20 第2頁左上欄第15行-第3頁左上欄第1 行 (ファミリーなし)	31, 33- 36, 38- 40
Y	同上	9
X	JP 63-032478 A (農林水産省食品総合研究所) 1988. 02. 12 特許請求の範囲、第3頁右下欄第14行- 第4頁右下欄第4行 (ファミリーなし)	32-40
X	JP 10-296060 A (オルガノ株式会社) 1998. 11. 10 [0015]-[0018] (ファミリーなし)	41, 42
X	JP 05-023547 A (日新電機株式会社) 1993. 02. 02 [0007] (ファミリーなし)	44

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 2000-298109 A (財団法人神奈川科学技術アカ デミー) 2000. 10. 24 [0002]-[0024] (ファミリーなし)	1-9, 13, 15, 23, 24
Y	EP 0701857 A1 (BEND RESERCH, INC.) 1996. 03. 20 第4頁第37行-同頁第47行, Fig. 1 & JP 08-168655 A & US 5681433 A	15
Y	JP 06-254362 A (レンゴー株式会社, 日立造船株式会 社) 1994. 09. 13 特許請求の範囲, [0021] (ファミリーなし)	15
Y	JP 10-085568 A (東燃株式会社) 1998. 04. 07 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	13, 23, 24
Y	JP 2000-105219 A (三洋電機株式会社) 2000. 04. 11 [0002] (ファミリーなし)	19

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USFTO)